



Nanostrukturierte Metallelektroden zur funktionalen Kopplung an neuronale Zellen

Dorothea Brüggemann

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Nanosysteme (IBN)
Bioelektronik (IBN-2)

Nanostrukturierte Metallelektroden zur funktionalen Kopplung an neuronale Zellen

Dorothea Brüggemann

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Information / Information

Band / Volume 9

ISSN 1866-1777

ISBN 978-3-89336-627-9

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Herausgeber Forschungszentrum Jülich GmbH
und Vertrieb: Zentralbibliothek, Verlag
52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2010

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Information / Information Band / Volume 9

D 82 (Diss., RWTH Aachen, Univ., 2010)

ISSN 1866-1777
ISBN 978-3-89336-627-9

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder
unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	viii
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	5
3 Grundlagen	7
3.1 Extrazelluläre Ableitsysteme	7
3.2 Modifikation von planaren Mikroelektroden-Arrays	9
3.2.1 Elektrodenmaterialien	10
3.2.2 Mikro- und Nanostrukturierungstechniken	13
3.3 Nanopillarherstellung in nanoporösen Aluminiumoxid-Membranen	16
3.4 Elektrochemische Methoden	20
3.4.1 Impedanzspektroskopie	20
3.4.2 Zyklovoltametrie	26
3.4.3 Elektrochemische Untersuchungen an Nanostrukturen	30
3.5 Zellwachstum auf Substraten	32
3.5.1 Aufbau und Funktionsweise von Zellen	32
3.5.2 Zellwachstum auf mikro- und nanostrukturierten Substraten	36
3.5.3 Das Hodgkin-Huxley Modell zur Simulation von Neuronen	39
3.5.4 Kopplungsmodell für Zellen auf Mikroelektroden	41
4 Methoden und Materialien	45
4.1 Herstellung von Gold-Nanopillar-Arrays	45
4.1.1 Anodisierung von Aluminiumsubstraten	45
4.1.2 Galvanisierung	47
4.2 Charakterisierung der Nanostrukturen	50
4.2.1 Rasterelektronenmikroskopie	50
4.2.2 Statistische Analyse der Nanostrukturen	51

4.2.3	Elektrochemische Eigenschaften	53
4.3	Zellkopplung an Gold-Nanopillars	56
4.3.1	Oberflächenmodifikationen für verschiedene Zelltypen	57
4.3.2	Live-Dead-Staining mittels Fluoreszenzmikroskopie	59
4.3.3	Fixierung und Kritisch-Punkt-Trocknung	60
4.3.4	Zell-Nanostruktur-Schnitte durch fokussierten Ionenstrahl	61
4.4	Mikroelektroden-Arrays	62
4.4.1	Fabrikation im Reinraum	62
4.4.2	Chip-Aufbau und Verkapselung	67
4.5	Ableitung extrazellulärer Signale von Zellkulturen	69
5	Ergebnisse	71
5.1	Analyse der Geometrie von Gold-Nanopillar-Arrays mittels Rasterelektronenmikroskopie	71
5.2	Elektrochemische Charakterisierung von Gold-Nanopillar-Elektroden	73
5.2.1	Zyklovoltametrie	74
5.2.2	Impedanzspektroskopie	82
5.3	Zellwachstum auf Gold-Nanopillar-Oberflächen	85
5.3.1	Grillen neuronen	85
5.3.2	Ratten neuronen	87
5.3.3	HL1- und HEK-Zellen	103
5.4	Nanostrukturierung von Gold-Mikroelektroden	109
5.5	Signalableitung mit nanostrukturierten MEAs	116
5.5.1	Ableitung extrazellulärer Signale von elektroaktiven Zellen	116
5.5.2	Elektrochemische Charakterisierung von nanostrukturierten und planaren MEAs	127
6	Diskussion	133
6.1	Geometrische und elektrochemische Analyse von Gold-Nanopillars	133
6.2	Zellwachstum auf Gold-Nanopillar-Oberflächen	136
6.3	Signalableitung mit nanostrukturierten Gold-MEAs	139
7	Ausblick	145
	Literaturverzeichnis	149
	Danksagung	159

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schema eines Neurons auf planarer Elektrode	6
3.1	Erstes Design von planaren Mikroelektroden-Arrays	8
3.2	Metallelektroden-Array mit 64 Goldelektroden	9
3.3	Unterschiedliche Elektrodenmaterialien	10
3.4	Platinspitzen auf MEAs von Thiébaud	13
3.5	Aktionspotenziale abgeleitet an Hippocampus-Gewebe	14
3.6	Nanostrukturierung von Mikroelektroden	15
3.7	Transistor-Array aus Nanowires	16
3.8	Ideale hexagonale Nanoporen in Al_2O_3	17
3.9	Phasen des Porenwachstums in Al_2O_3 während der Anodisierung	17
3.10	Formation von Nanoporen in Al_2O_3	18
3.11	Schema der hexagonalen Porenstruktur in Al_2O_3	19
3.12	Wechselstrom-Ersatzschaltbild einer Halbzelle: Randles-Plot	22
3.13	Nyquist-Diagramm: Ortskurve der Elektrodenimpedanz	24
3.14	Warburg-Impedanz im Nyquist-Plot	24
3.15	Bode-Plot: frequenzabhängige Darstellung der Impedanz	25
3.16	Dreiecksspannung zur Aufnahme von Zyklovoltamogrammen	27
3.17	Zyklovoltamogramm einer Platinelektrode in KOH	28
3.18	Typisches Zyklovoltamogramm eines reversiblen Redoxsystems	29
3.19	Verschiedene Diffusionsverhältnisse an Nanopillar-Arrays	30
3.20	Plasmamembran einer Zelle	32
3.21	Veränderung des Membranpotenzials an einem Neuron	33
3.22	Bewegung einer Zelle auf einem Substrat	36
3.23	Verschiedene Zelltypen auf Nanostrukturen	38
3.24	Elektrischer Schaltkreis zur Beschreibung einer neuronalen Zellmembran	40
3.25	Schematische Darstellung eines Neurons auf einer Mikroelektrode	41
3.26	Ersatzschaltbild eines Neurons mit Elektrodenkontakt	42
3.27	Ersatzschaltbild für die Kopplung zwischen Neuron und Siliziumchip	42

4.1	Anodisierungszelle aus PMMA mit Pt-Elektrode	46
4.2	LabView-Programm zur Steuerung der Anodisierung	47
4.3	Versuchsaufbau zur Galvanisierung in Kaliumgoldcyanid	48
4.4	Pillarherstellung in vier Stufen	49
4.5	Berechnung der realen Höhe von geneigten Objekten im REM	50
4.6	Automatische Erkennung der Nanoporen	51
4.7	Ermittlung verschiedener Porenparameter	52
4.8	Grundfläche der Nanopillar-Proben	53
4.9	Zyklovoltametrie und Impedanzspektroskopie an Gold-Nanostrukturen	54
4.10	Teflonzelle für elektrochemische Messungen	54
4.11	Modell eines Spannungsteilers zur Zellkopplung an eine Mikroelektrode	56
4.12	Schematischer Aufbau des FIB-Equipments	62
4.13	Herstellung von MEAs auf Si-Substraten	64
4.14	Herstellung von Gold-Nanopillars auf MEAs	66
4.15	Equipment zum Aufbau der MEA-Chips auf Carrierplatinen	68
4.16	Verkapselter Chip auf Carrierplatine	69
4.17	Aufbau zur Ableitung extrazellulärer Signale	70
4.18	Aufnahme von Aktionspotenzialen	70
5.1	Array aus Gold-Nanopillars	71
5.2	Zyklovoltamogramme für Gold-Nanopillars und planares Gold in NaCl	75
5.3	Zyklovoltamogramme für Gold-Nanopillars und planares Gold in KCl mit $K_4(Fe(CN)_6)$	77
5.4	Bestimmung der Peakstromhöhe	78
5.5	Abhängigkeit der Stromdichten von der Scangeschwindigkeit in KCl mit $K_4(Fe(CN)_6)$	81
5.6	Ersatzschaltbilder zur Auswertung der Impedanzmessungen	82
5.7	Impedanzspektren für Gold-Nanopillars und planare Goldsubstrate in NaCl	83
5.8	Grillen neuronen auf unbeschichteten Substraten	86
5.9	Grillen neuronen auf Substraten mit conA-Beschichtung	86
5.10	Ratten neuronen auf pECM-Beschichtung an Tag 4	87
5.11	Ratten neuronen auf Substraten mit pLL-Beschichtung	88
5.12	Ratten neuronen auf NH_2 -Beschichtung an Tag 4	90
5.13	Ratten neuronen auf MML-Beschichtung an Tag 4	91
5.14	Ratten neuronen auf NH_2 -Beschichtung an Tag 7	92
5.15	Ratten neuronen auf MML-Beschichtung an Tag 7	93

5.16	Neuronenwachstum an der Grenze zwischen Nanopillars und planarem Al-Rand	94
5.17	Überlebensraten von kortikalen Rattenneuronen auf Pillars und planaren Goldflächen	95
5.18	REM-Aufnahmen von Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars	96
5.19	Rattenneuron auf Gold-Nanopillars mit stark adhärierten Neuriten	96
5.20	REM-Aufnahmen von Rattenneuronen auf planarem Gold	97
5.21	Verschiedene Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars mit SAM-Beschichtung	98
5.22	FIB-Schnitte durch Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars	99
5.23	FIB-Schnitte durch Zellkörper und Dendrit von Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars	100
5.24	FIB-Schnitte durch Rattenneuronen auf planarem Gold	100
5.25	Staining der Aktinfilamente von Rattenneuronen	101
5.26	Rattenneuronen auf planaren pECM-Referenzen an Tag 4	103
5.27	Fluoreszenzfärbung von HL1-Zellen	104
5.28	Fluoreszenzfärbung von HEK-Zellen	105
5.29	REM-Aufnahmen von HL1-Zellen auf Gold-Nanopillars	106
5.30	REM-Aufnahmen von HEK-Zellen auf Gold-Nanopillars	106
5.31	REM-Aufnahmen von Zelllinien auf planarem Gold	107
5.32	FIB-Schnitte durch HL1-Zellen	108
5.33	FIB-Schnitte durch HEK-Zellen	109
5.34	Passivierung von Gold-MEAs mit SU8	110
5.35	Passivierung von Gold-Leiterbahnen mit Parylen	111
5.36	MEA-Chips mit ONO-Schichten des IBN-2	111
5.37	MEA-Chips mit ONO-Schichten von Oxford Instruments	112
5.38	Elektrochemische Kupferabscheidung durch Pinholes in der NONONO-Passivierung	113
5.39	Mangelnde Haftung der ONO-Schicht von caesar	114
5.40	REM-Aufnahmen von nanostrukturierten Mikroelektroden	115
5.41	HL1-Kulturen an DIV 4 auf planaren und nanostrukturierten Gold-MEAs	117
5.42	Live-Dead-Staining einer HL1-Kultur auf nanostrukturierten MEAs	117
5.43	Ableitung von Aktionspotenzialen mit nanostrukturierten MEAs	118
5.44	Signalamplituden für MEAs mit 8 μm Durchmesser	119
5.45	Signalamplituden für MEAs vom Durchmesser 10 μm	120
5.46	Signalamplituden für MEAs mit 15 μm Durchmesser	121
5.47	Signalamplituden für MEAs mit 20 μm Durchmesser	121
5.48	Signal-Rausch-Verhältnis für MEAs mit 8 μm Durchmesser	123

5.49	Signal-Rausch-Verhältnis für 10 μm große MEAs	124
5.50	Signal-Rausch-Verhältnis für MEAs vom Durchmesser 15 μm	125
5.51	Signal-Rausch-Verhältnis für MEAs mit 20 μm Durchmesser	126
5.52	Umgeknickte Nanopillars auf einer mehrfach verwendeten Elektrode	127
5.53	Ersatzschaltbild zur Auswertung der Impedanzmessungen an MEAs	127
5.54	Auswertung der Impedanzspektren an MEAs mit 8 μm Durchmesser	128
5.55	Auswertung der Impedanzspektren an MEAs mit 10 μm Durchmesser	128
5.56	Auswertung der Impedanzspektren an MEAs mit 15 μm Durchmesser	129
5.57	Auswertung der Impedanzspektren an MEAs mit 20 μm Durchmesser	130
5.58	Transfercharakteristika unterschiedlicher Mikroelektroden	131
6.1	Erweitertes Modell eines Spannungsteilers zur Zellkopplung an eine Mikro- elektrode	142
7.1	Vorstrukturierte Bündel von Gold-Nanopillars	146
7.2	Neuronen auf nanostrukturierten MEAs	147

Tabellenverzeichnis

3.1	Verschiedene poröse Elektrodenmaterialien	11
3.2	Unterschiedliche planare Elektrodenmaterialien	12
5.1	Geometrische Untersuchung von Gold-Nanopillars mittels REM	72
5.2	Vergrößerung der geometrischen Fläche von Gold-Nanopillar-Elektroden, die für elektrochemische Untersuchungen relevant ist	74
5.3	Zyklovoltametrisch bestimmte Oberflächenvergrößerung für Gold-Nanopillars in NaCl	76
5.4	Kapazitäten für planare Goldsubstrate in NaCl	76
5.5	Peakströme von Gold-Nanopillars in KCl mit $K_4(Fe(CN)_6)$	79
5.6	Peakströme von planaren Goldsubstraten in KCl mit $K_4(Fe(CN)_6)$	79
5.7	Oberflächenvergrößerung durch Gold-Nanopillars, ermittelt aus Peakströ- men in KCl mit $K_4(Fe(CN)_6)$	80
5.8	Abhängigkeit der Peakstromdichten von der Scangeschwindigkeit in KCl mit $K_4(Fe(CN)_6)$	80
5.9	Fit der Impedanzspektren von Gold-Nanopillar-Elektroden in NaCl mit R-CPE-Modell	83
5.10	Fit von Impedanzspektren planarer Goldoberflächen in NaCl mit R-C- Ersatzschaltbild	84
5.11	Oberflächenvergrößerung von Gold-Nanopillars gegenüber planarem Gold, bestimmt aus Impedanzspektren in NaCl	85
5.12	Vergleich der Signalamplituden von HL1-Zellen auf nanostrukturierten und planaren MEAs	122
5.13	Vergleich des Signal-Rausch-Verhältnisses von nanostrukturierten und pla- naren MEAs	126
5.14	Auswertung von Transfermessungen und Impedanzspektren für $10\ \mu m$ große MEAs	131
6.1	Kennwerte verschiedener Elektrodentypen	143

1 Zusammenfassung

In der modernen biomedizinischen Forschung steigt stetig die Nachfrage nach neuartigen Biosensoren, die die Schnittstelle zwischen physikalischen und biologischen Systemen bilden. Solche bioelektronischen Systeme werden z.B. zur Ableitung extrazellulärer Signale von elektrisch aktiven Zellen oder zur Detektion von DNA eingesetzt. In zunehmendem Maße finden sie auch Verwendung als Neuroimplantate oder Testsysteme für neue pharmazeutische Wirkstoffe.

Zur Ableitung extrazellulärer Signale wurden bislang planare Mikroelektroden aus verschiedenen biokompatiblen Metallen verwendet, die seit den 70er Jahren in der Bioelektronik etabliert sind. Um die Qualität der abgeleiteten Signale zu verbessern, wurde das Elektrodendesign stetig weiterentwickelt. Maßgebend für die Signalqualität ist das Signal-Rausch-Verhältnis (SRV), das durch die Schnittstelle zwischen Zelle und Elektrode bestimmt wird. Die Vergrößerung der effektiven Elektrodenoberfläche mit unterschiedlichen porösen Materialien hat bereits zu einer Erhöhung des SRVs geführt. Allerdings zeigten bisherige poröse Elektroden Probleme in der mechanischen Stabilität und der Adhäsion von Zellen und Gewebe. Überdies ist die Herstellung aufwändig und eine Wiederverwendung der Elektroden nur eingeschränkt möglich.

Einen neuen, vielversprechenden Lösungsansatz zur Verbesserung der Signableitung stellt die Modifikation von Mikroelektroden-Arrays (MEAs) mit dreidimensionalen metallischen Nanostrukturen dar. Die Entwicklung und Charakterisierung dieser nanostrukturierten Biochips sowie deren Kopplung an elektrisch aktive Zellen bildeten den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Als Material für die Nanostrukturen wurde Gold gewählt, da es aufgrund seiner chemischen und mechanischen Beständigkeit sowie seiner Biokompatibilität für bioelektronische Anwendungen prädestiniert ist. Außerdem besteht über Thiolbindungen die Möglichkeit verschiedener Oberflächenmodifikationen zur gezielten Beeinflussung des Zellwachstums.

Zunächst wurden mittels nanoporöser Aluminiumoxid-Membranen und elektrochemischer Deposition großflächige Arrays aus Gold-Nanopillars hergestellt. Durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden Zusammenhänge zwischen der Nanostruktur-Geometrie und den Parametern des Herstellungsprozesses gefunden. Die resultierenden Nanopillars waren 300 bis 400 nm hoch und hatten einen mittleren Durchmesser von ca. 60 nm. Es folgten elektrochemische Untersuchungen der Nanopillar-Arrays mittels Impedanzspektroskopie und Zykelvoltametrie. Diese Studien belegten, dass die effektive Oberfläche aufgrund der Nanostrukturen deutlich erhöht war. Durch die Oberflächenvergrößerung konnte die Impedanz gegenüber planaren Goldflächen erheblich gesenkt werden. Demnach war die Kapazität der Nanopillars im Vergleich zu planarem Gold sogar um eine Größenordnung erhöht.

Nach der geometrischen und elektrochemischen Charakterisierung der Gold-Nanopillar-Arrays wurde die Vitalität und Adhäsion verschiedener elektroaktiver Zellen auf diesen Flächen studiert, um ihre Eignung als bioelektronische Schnittstelle zu evaluieren. Zur Optimierung des Zellwachstums wurden die Nanostrukturen in Abhängigkeit vom Zelltyp mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen, wie z.B. Proteinen oder Self-Assembled Monolayers versehen. Die Überlebensrate der verschiedenen Zelltypen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Herzmuskelzellen (HL1) und Nierenepithelzellen (HEK) zeigten eine gute Adhäsion sowie eine hohe Überlebensrate auf den Gold-Nanopillar-Oberflächen, die vergleichbar zur Entwicklung dieser Zelllinien auf planarem Gold waren. Für primäre Rattenneuronen (RCN) wurden allerdings eine unerwartet niedrige Zellvitalität und schwache Adhäsion auf den Nanostrukturen beobachtet, die sich stark vom Zellwachstum auf planaren Goldsubstraten unterschieden. Weiterführende Untersuchungen der Schnittstelle zwischen Zelle und Nanopillar-Arrays durch einen fokussierten Ionenstrahl zeigten eine dichte Kopplung von HL1- und HEK-Zellen an die Nanostrukturen. Für RCN auf Nanopillars wurde zwar eine starke Adhäsion der Neuriten beobachtet, allerdings waren die Abstände zwischen Zellkörper und Pillars auffallend hoch. Zudem ergaben Untersuchungen der Aktinfilamente mittels Fluoreszenzfärbung starke Veränderungen der neuronalen Wachstumskegel, die für die schwache Adhäsion von RCN mitverantwortlich sein können. Damit wurde nachgewiesen, dass HL1- und HEK-Zellen dicht an Gold-Nanostrukturen koppeln. Die Adhäsion von RCN auf den Nanopillars war dagegen stark eingeschränkt und hing zudem von der jeweiligen Zellregion ab, die in Kontakt mit den Pillars war.

Im letzten Versuchsteil erfolgte der Schritt von großflächigen Gold-Nanopillar-Arrays hin zu nanostrukturierten MEAs. Zur Fabrikation dieser neuartigen Biochips wurden Mikro-

fabrikationstechniken (Photolithographie, Metallisierung, Passivierung und Ätzprozesse) im Reinraum eingesetzt, danach folgte die Nanostrukturierung. Für die Ableitung extrazellulärer Signale wurden aufgrund der zuvor nachgewiesenen starken Kopplung an Gold-Nanopillars HL1-Zellen gewählt. Mit den Nano-MEAs konnten reproduzierbare Aktionspotenziale von HL1-Zellen abgeleitet werden. Ein Vergleich des SRVs mit Referenzmessungen an planaren Gold-MEAs zeigte, dass die Signalqualität bei Ableitungen mit nanostrukturierten MEAs maximal um den Faktor 2 erhöht war.

Im Vergleich zur elektrochemisch ermittelten Kapazitätserhöhung an großflächigen Arrays aus Gold-Nanopillars, die eine ganze Größenordnung betrug, ist dieser Vergrößerungsfaktor relativ gering. Allerdings ist durch eine Modifikation der Nanopillar-Geometrie, vor allem der Höhe, eine weitere Vergrößerung des SRVs von nanostrukturierten MEAs zu erwarten. Starken Einfluss auf die Signalqualität hat auch die Passivierungsschicht der MEAs. Um Leckströme bei der Signableitung zu vermeiden, die das SRV negativ beeinflussen, sollte die Passivierung möglichst dicht und chemisch stabil sein. Außerdem kann in Zukunft durch die Verwendung von einzelnen Nanopillars eine zunehmende Miniaturisierung der Elektroden erreicht werden. Mit diesem Design könnte später vielleicht sogar die Ableitung von intrazellulären Signalen durch Eindringen der Pillars in den Zellkörper erreicht werden.

2 Einleitung

Bioelektronische Systeme ermöglichen Studien über die Entwicklung neuronalen Gewebes sowie zu dessen synaptischer Verschaltung und den Netzwerkeigenschaften. Im Vordergrund dieser Studien steht das Streben nach einem besseren Verständnis der Mechanismen bioelektronischer Signalprozesse. Auf der Basis dieses Wissens werden die durch Evolution optimierten, hochempfindlichen und selektiven biologischen Erkennungssysteme und Signalverstärkungskaskaden mit technischen Signalerkennungs- und Signalwandlungssystemen gekoppelt. Hierdurch eröffnen sich ganz neue Möglichkeiten für die Entwicklung von Biosensoren und bioelektronischen Bauelementen in den Anwendungsbereichen Informationstechnologie, Biologie und Medizin.

Eine Voraussetzung für die Entwicklung solcher Systeme ist die gleichzeitige Signalableitung von mehreren einzelnen neuronalen Zellen im Netzwerk durch nicht-invasive Kontakte mit den einzelnen Elektroden. Insbesondere Metallelektroden-Arrays (MEAs) eignen sich für die Mittel- bis Langzeiterfassung sowohl der spontanen als auch der induzierten Aktivität in neuronalen Netzwerken und ihrer räumlich-zeitlichen Entwicklung (Dynamik). Besonders wichtig für die Signalableitung in solchen bioelektronischen Systemen sind die Eigenschaften der Grenzfläche zwischen individueller Zelle und Elektrode.

Bisherige experimentelle Daten und theoretische Überlegungen haben gezeigt, dass die räumliche Distanz zwischen Zellmembran und Elektrode ein Haupthindernis in allen elektronischen Biochips darstellt, die auf planarem Elektrodendesign basieren ^[1–5]. Der hohe Abstand im Zell-Elektroden-Interface ist schematisch in Abb. 2.1 für ein Neuron auf einer planaren Elektrode dargestellt. Die Folge hiervon ist ein geringes Verhältnis von Signalamplitude zu Signalrauschen.

Einen viel versprechenden Lösungsansatz für dieses Problem stellt die dreidimensionale (3D)-Nanostrukturierung der Elektroden dar, wodurch die effektive Elektrodenoberfläche erhöht wird. Dies resultiert in einer höheren Kapazität bzw. einer geringeren Elektro-

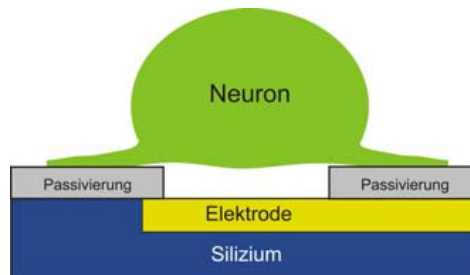


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines Neurons auf einer planaren Elektrode

denimpedanz, was zu einer Senkung des Signalrauschens führt. Überdies könnte es durch Nanostrukturen möglich sein den Abstand zwischen Zelle und Elektrode zu verringern und so ein geringeres Elektrodenpotenzial bei Zellstimulation zu erzielen. Außerdem wird vermutet, dass die Verwendung von metallischen Nanostrukturen die Adhäsionsmechanismen der Zellen auf den MEAs positiv beeinflusst. Beides könnte in einer verbesserten Übertragung der Signale sowohl bei der Ableitung als auch bei der Stimulation resultieren. Im Vergleich zu bisher verwendeten porösen Elektrodenmaterialien wie Platin Black oder Ti_3N_4 weisen metallische Nanostrukturen auch eine höhere Langzeitstabilität auf, so dass die Messungen nicht durch strukturelle Defizite beeinträchtigt werden. In einer Weiterentwicklung von Nanopillars zu Nano-Tips könnte sogar versucht werden, in die Zellmembran einzudringen und so intrazelluläre Messungen zu ermöglichen.

In dieser Dissertation wurden neuartige Sensorchips entwickelt und mit elektroaktiven Zellen zur extrazellulären Signableitung eingesetzt. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung von neuronalen elektronischen biohybriden Systeme. Die Basis für diese Systeme bildeten 3D-nanostrukturierte Goldelektroden-Arrays. Diese 3D-nanostrukturierten MEA-Biochips wurden mit Hilfe von nanoporösen Aluminiumoxid-Membranen und Mikrofabrikationstechniken hergestellt. Durch die 3D-Nanostrukturierung und zusätzliche Methoden der Oberflächenmodifikation wurden die elektrochemischen Eigenschaften von MEAs sowie deren Kopplung an neuronale Zellen verbessert. Insbesondere stand hierbei im Vordergrund, wie die Nanostrukturen das Wachstum und die Adhäsion verschiedener elektroaktiver Zellen beeinflussen und welche Charakteristika die Nanostrukturen in elektrochemischen Studien zeigten. Die Modifikation von MEAs mit Gold-Nanopillars ermöglichte dann eine optimierte Analyse der räumlich-zeitlichen Dynamik in rekonstruierten neuronalen Netzwerken. In zukünftigen Studien sind mit diesen nanostrukturierten MEAs z.B. Untersuchungen der pharmakologisch induzierten Kurz- und Langzeit-Plastizität sowie Pharmanachweise möglich.

3 Grundlagen

3.1 Extrazelluläre Ableitsysteme

Die zunehmenden Möglichkeiten der *in vitro*-Kultivierung verschiedenster Zell- und Gewebearten haben in den vergangenen Jahrzehnten zur Klärung wesentlicher Fragestellungen der Elektrophysiologie beigetragen. Im Mittelpunkt stehen hierbei Fragen nach den Mechanismen der Ausbreitung elektrischer Signale in Zellnetzwerken sowie nach der Entwicklung und Funktionsweise in der synaptischen Plastizität von Zellwechselwirkungen.

Zu deren Klärung stellten Thomas et al. 1972 als erste die Idee vor, mit Hilfe eines planaren 30-Mikroelektroden-Arrays (MEA) nicht-invasive simultane Langzeit-Messungen in Zellnetzwerken vorzunehmen ^[6]. Thomas nutzte zur Mikrostrukturierung von dünnen Schichten Methoden der Planartechnik. Sein MEA bestand aus Glassubstraten, und darauf befanden sich 2 Reihen mit jeweils 15 Goldelektroden, die in Abständen von $100\text{ }\mu\text{m}$ angeordnet waren (s. Abb. 3.1). Die einzelnen Goldelektroden waren $7\text{ }\mu\text{m} \times 7\text{ }\mu\text{m}$ groß und wurden elektrochemisch mit Platin Black beschichtet, um durch diese Oberflächenvergrößerung die Impedanz der Mikroelektroden zu senken. Photolack wurde als Isolierschicht auf diesen Elektroden verwendet, die Thomas in ersten *in vitro*-Experimenten zur Signalableitung an Hühner-Herzmuskelzellen einsetzte ^[7].

Bei der Ableitung konnte Thomas aufgrund des Elektrodendesigns noch keine Erfolge für Messungen an einzelnen Zellen erzielen. Er berichtete außerdem über Schwierigkeiten aufgrund einer niedrigen extrazellulären Impedanz. Dennoch legte diese Arbeit den Grundstein für weitere Entwicklungen von Mikroelektroden-Arrays.

Kurz darauf wurde im Jahr 1980 von Pine et al. die erste erfolgreiche extrazelluläre Signalableitung an getrennt kultivierten Neuronen von Säugetieren durchgeführt ^[5, 7]. Pine verwendete hierfür Arrays mit Goldelektroden, die - wie bei Thomas - mit Platin Black

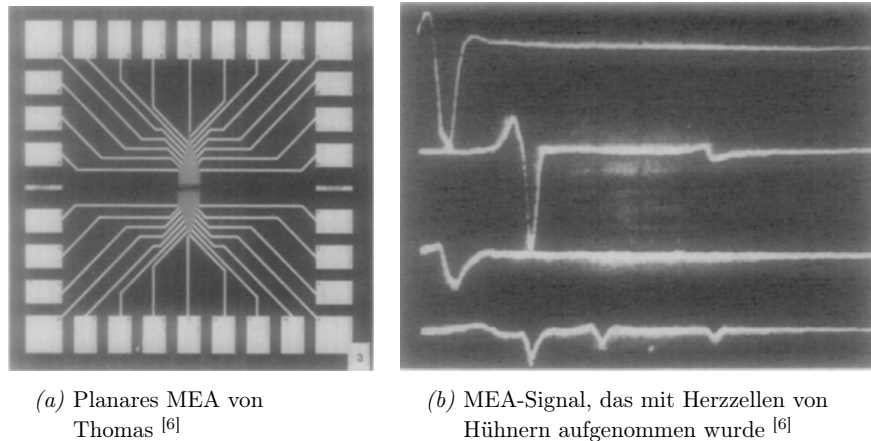


Abbildung 3.1: *Erstes Design von planaren Mikroelektroden-Arrays*

beschichtetet waren. Die Arrays bestanden aus 2 Reihen mit 16 Elektroden, die $10\mu\text{m}^2$ groß und jeweils $250\mu\text{m}$ voneinander getrennt waren. Als Isolierung wurde Siliziumdioxid verwendet. So gelang es der Gruppe von Pine Signale von 19 Zellen in 9 Kulturen aufzuzeichnen. Die Zellen waren dabei nicht in direktem Kontakt mit der Elektrode sondern ca. $25\mu\text{m}$ voneinander entfernt. Die Signal-Rausch-Verhältnisse lagen bei 5:1 bis 15:1. Neben der Ableitung von Signalen konnten Pine et al. schließlich zeigen, dass ihre Elektroden außerdem zur Stimulation von Zellen genutzt werden können.

Am IBN-2 werden derzeit MEAs mit 64 Elektroden verwendet (s. Abb. 3.2), wie sie bei Gross und Taketani beschrieben sind [8, 9]. Eine weitere Möglichkeit zur Ableitung extrazellulärer Signale stellen Feldeffekt-Transistoren (FETs) dar [10, 11], die ebenfalls Gegenstand der aktuellen Forschung am IBN-2 sind jedoch nicht in der vorliegenden Arbeit behandelt werden. MEAs haben sich inzwischen für vielfältige Anwendungen in der Biosensorik und teilweise in der Neuroprothetik etabliert [8, 12–14].

Bei der Herstellung von Biochips mit MEAs sind folgende Faktoren wichtig [7]:

- Die Biokompatibilität der verwendeten Materialien ist zwingend erforderlich, d.h. sie dürfen keinen toxischen Effekt auf die Zellkulturen oder das Gewebe haben.
- Elektrodenmaterialien sollten eine gute Adhäsion der biologischen Präparate ermöglichen, um die Ableitung der elektrischen Signale zu vereinfachen.

- Die elektrischen Eigenschaften der Elektroden sollten es erlauben besonders kleine Signalamplituden mit einem geringen Rauschen aufzuzeichnen.
- Eine möglichst günstige Herstellung und geringe Materialkosten sind ebenfalls wünschenswert.

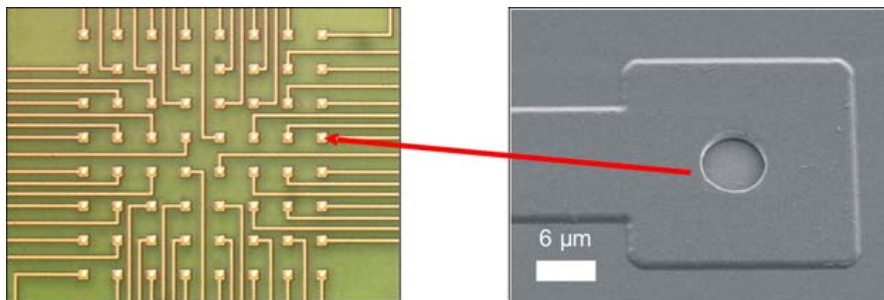


Abbildung 3.2: Metallelektroden-Array mit 64 Goldelektroden

Links: Lichtmikroskopische Aufnahme

Rechts: REM-Aufnahme

3.2 Modifikation von planaren Mikroelektroden-Arrays

Aufgrund der einzigartigen Möglichkeit zur nicht-invasiven Ableitung von extrazellulären Signalen und zur gezielten Stimulation von Zellen wurden MEAs und die zugehörigen Techniken der Zellkultur nach diesen Anfängen stetig weiterentwickelt. Durch verschiedene Ansätze wurden die Elektrodendesigns der MEAs modifiziert, um die Kopplung zwischen Zelle und Elektrode dahingehend zu verbessern, dass ein möglichst geringes Signalrauschen während der Signableitung auftritt. Neben einer geringen Elektrodenimpedanz sind dabei auch andere Aspekte wichtig, z.B. die mechanische und chemische Stabilität der Elektroden oder Möglichkeiten für Oberflächenmodifikationen zur gezielten Beeinflussung der kultivierten Zellen.

Bei der Modifikation der MEA-Designs wurden einerseits unterschiedliche Elektrodenmaterialien getestet, und zum anderen kamen verschiedene Mikro- und Nanostrukturierungstechniken zum Einsatz, die im folgenden kurz vorgestellt werden.

3.2.1 Elektrodenmaterialien

Als Elektrodenmaterialien werden derzeit standardmäßig Gold, Indium-Zinnoxid (ITO) und Platin verwendet. Zwei Alternativen zu diesen planaren Elektrodenmaterialien stellen poröses Titannitrid (Ti_3N_4) und schwammartiges Platin Black dar. All diese Materialien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer elektrischen Eigenschaften, so dass sie für verschiedene Anwendungsgebiete eingesetzt werden [7]. Am IBN-2 werden sowohl planares Gold (s. Abb. 3.3(a)) als auch platierte Goldelektroden (s. Abb. 3.3(b)) zur Untersuchung von Zellsignalen verwendet.

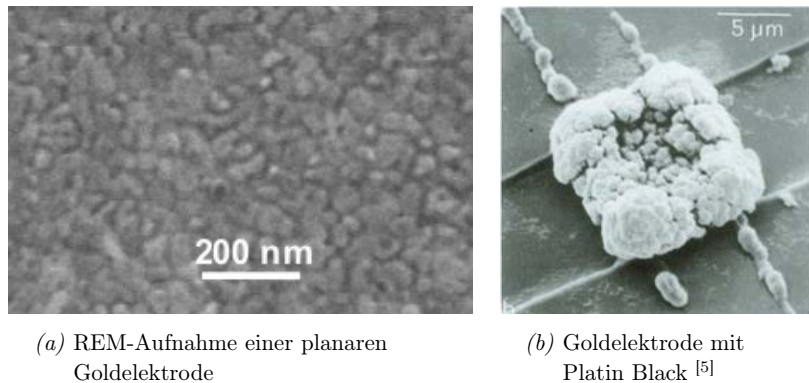


Abbildung 3.3: Unterschiedliche Elektrodenmaterialien

Sollen elektrische Signale mit geringer Amplitude aus biologischen Systemen abgeleitet werden, sind poröse Elektrodenmaterialien wie Platin Black und Ti_3N_4 aufgrund ihrer erhöhten Oberfläche gut geeignet. Sie besitzen eine geringere Impedanz und damit eine höhere Kapazität als vergleichbare planare Elektroden aus Gold, was sie für eine rauscharme Signalableitung in biologischen Systemen prädestiniert [5, 15]. Gleichzeitig ist es durch die vergrößerte Oberfläche auf einfachere Weise möglich, elektrische Signale in Zellen einzukoppeln und diese zu stimulieren [2, 4, 7, 9].

Obwohl Elektroden mit Platin Black derzeit vorwiegend in MEAs zum Einsatz kommen, weisen sie einige Defizite auf, die auch bei Ti_3N_4 beobachtet wurden. Aufgrund ihrer Porosität sind die mechanische Stabilität und die Adhäsion auf diesen Elektroden gering, was häufig zur Ablösung der porösen Schicht bei der Elektrodenreinigung, z.B. im Ultraschallbad, führen kann. Darüber hinaus können poröse Elektroden sehr leicht mit

Proteinen verstopfen ^[7]. Als Kompromiss zwischen guten elektrischen Eigenschaften, mechanischer Stabilität und verhältnismäßig günstiger Herstellung werden daher teilweise auch metallische Platinelektroden eingesetzt ^[2].

Die Vor- und Nachteile poröser Elektrodenmaterialien sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Poröse Elektrodenmaterialien: Pt Black und Ti_3N_4	
Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> - Hohe spezifische Oberfläche → Geringe Impedanz → Hohe Kapazität - Geeignet für geringe Signalamplituden, z.B. in biologischen Systemen 	<ul style="list-style-type: none"> - Geringe mechanische Stabilität - Blockieren durch Proteine - Aufwändige Herstellung - Adhäsionsprobleme zwischen Zellen und Gewebe

Tabelle 3.1: Vor- und Nachteile verschiedener poröser Elektrodenmaterialien

Den porösen Elektrodenmaterialien stehen die planaren Materialien ITO und Gold gegenüber. Wird die gleichzeitige Aufzeichnung optischer und elektrischer Signale angestrebt, eignen sich ITO-Elektroden aufgrund ihrer Transparenz am besten ^[7, 16]. Allerdings bestehen hier Defizite in der hohen Impedanz dieses Elektrodentyps, was niedrige Elektrodenkapazitäten bedingt.

Planare Goldelektroden eignen sich besonders gut zur Signableitung in Netzwerken aus neuronalen Zellen. Im Gegensatz zu den o.g. porösen Materialien zeichnet sich Gold durch eine hohe mechanische und chemische Stabilität aus und lässt sich zudem leicht chemisch modifizieren. So können auf die Goldoberfläche gezielt Adhäsionsmoleküle, z.B. in Form von Self-Assembled Monolayers (SAMs), aufgebracht werden ^[17]. SAMs können mit einer Thiolgruppe (-SH) synthetisiert werden, über deren Schwefelbindung die Kopplung an Goldoberflächen erfolgt. Auf einfache Weise können sie mit spezifischen Schlüsselsequenzen aus Peptiden versehen werden, die das Zellwachstum fördern. Ein Beispiel einer solchen Aminosäuresequenz stellt PA22-2 dar. Dabei handelt es sich um ein Fragment des Peptids Laminin, welches die Zelladhäsion und das Neuritenwachstum fördert ^[18–21].

Einen Überblick über die Vor- und Nachteile planarer Elektrodenmaterialien gibt Tab. 3.2:

Planare Elektroden			
Au		ITO	
Vorteile	Nachteile	Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> - Hohe mechanische Stabilität - Hohe chemische Beständigkeit - Möglichkeit zur Oberflächenmodifikation durch Thiolgruppen 	<ul style="list-style-type: none"> - Hohe Impedanz 	<ul style="list-style-type: none"> - Transparenz 	<ul style="list-style-type: none"> - Hohe Impedanz - Niedrige Kapazität - Hohes Signalrauschen

Tabelle 3.2: Vor- und Nachteile verschiedener planarer Elektrodenmaterialien

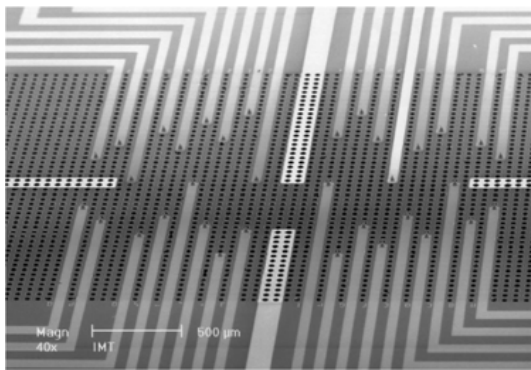
Als Substrat für MEA-Biochips wird heutzutage überwiegend Glas verwendet [2, 8, 9, 22–24]. Eine weit verbreitete Alternative stellen transparente Polymersubstrate dar, die für besser kontrollierbare *in vitro*-Bedingungen auch in perforierter oder flexibler Form eingesetzt werden [7, 25–27]. Diese transparenten Substrate ermöglichen die unkomplizierte Beobachtung des Zellwachstums mit einem Durchsichtsmikroskop. Glas verfügt außerdem über vorteilhafte chemische Eigenschaften und eine gute elektrische Isolierung. Oftmals werden auch Siliziumwafer als Substrat eingesetzt [28]. In dieser Arbeit finden sie ebenfalls Verwendung als Substratmaterial. Wegen der Lichtundurchlässigkeit wird dann Fluoreszenzmikroskopie für die Überwachung des Zellwachstums verwendet. Si-Wafer eignen sich besonders gut als Substratmaterial der Planartechnologie, wenn die Signableitung über Feldeffekt-Transistoren oder für integrierte Signalverstärkung und zur Signalfilterung auf einem Chip verwendet werden sollen. Auf Si-Substraten müssen die Elektroden dann allerdings durch eine Isolierschicht vom Substrat getrennt werden. Diese Schicht vermeidet bei der Signableitung auftretende Kurzschlüsse und parasitäre Kapazitäten an der Schnittstelle zwischen den Leiterbahnen und der leitenden Nährlösung der Zellkultur [7].

Isolierschichten für Biochips sollten eine möglichst niedrige dielektrische Konstante besitzen oder verhältnismäßig dick sein. Weit verbreitete Materialien, die diesen Anforderungen gerecht werden, sind Siliziumnitrid und Siliziumdioxid. Aber auch Polymere wie Polyimid, Parylen und SU8-Epoxid finden als Isolierschicht von MEAs Verwendung. Polymere können sogar mit höheren Schichtdicken deponiert werden als Siliziumnitrid oder Siliziumdioxid und sind oftmals photosensitiv, was ihre anschließende Bearbeitung mittels

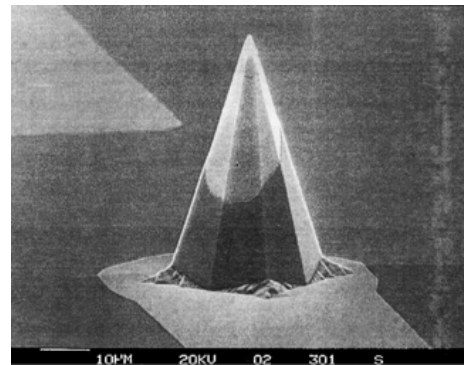
Photolithographie vereinfacht [7, 29]. Allerdings sind Polymere selten langfristig stabil, da sie häufig degenerieren und infolgedessen porös werden.

3.2.2 Mikro- und Nanostrukturierungstechniken

Die Gruppe von Thiébaud verwendete Mikrostrukturierungstechniken für die Modifikation der Elektrodenform. Mittels nasschemischen Ätzens wurden zunächst dreidimensionale Spitzen aus Silizium hergestellt [30, 31], die in das darauf liegende Gewebe eindringen. So sollte vermieden werden, dass sich eine Lage aus toten Zellen zwischen dem Gewebe und den Elektroden ablagert, die in anderen Anordnungen oftmals die Signalableitung störte. Die Spitzen waren ca. $47\text{ }\mu\text{m}$ hoch, und die oberen $15\text{ }\mu\text{m}$ wurden galvanisch mit Platin bedeckt (s. Abb. 3.4). Mit diesen oberflächenmodifizierten MEAs konnten Thiébaud et al. erfolgreich über mehrere Tage Signale aus Hippocampus-Gewebescheiben ableiten [27]. Allerdings traten während der Experimente Probleme mit der mechanischen Stabilität dieser Platinspitzen auf.



(a) REM-Bild von Thiébauds MEAs [30]



(b) REM-Bild einer einzelnen Platinspitze [31]

Abbildung 3.4: Platinspitzen auf MEAs von Thiébaud

Einen ähnlichen Ansatz wie Thiébaud wählte die Gruppe von Heuschkel [2]. Sie produzierten ebenfalls pyramidenförmige Platinelektroden und konnten an Hippocampus-Gewebe nachweisen, dass durch die dreidimensionalen Elektroden die Qualität der abgeleiteten Aktionspotenziale verbessert wird, wie in Abb. 3.5 zu sehen ist.

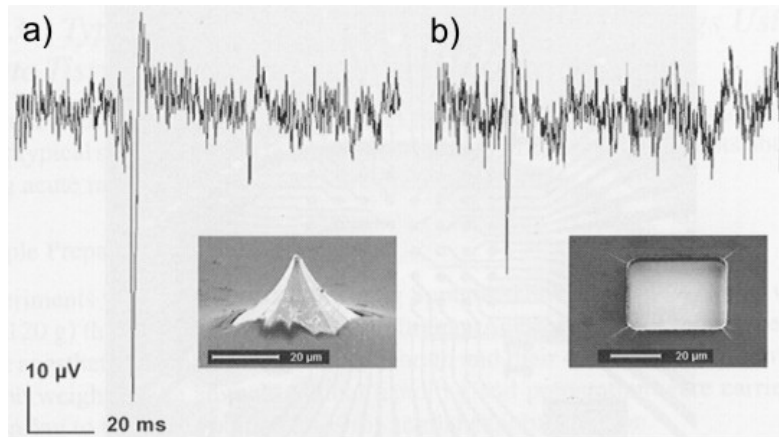


Abbildung 3.5: Aktionspotenziale abgeleitet an Hippocampus-Gewebe
a) mit Platinspitze b) mit planarer Elektrode

Später entwickelten Isik et al. das Design von Heuschkels Mikroelektroden dahingehend weiter, dass sie den unteren Teil der spitzen Elektroden mit Siliziumnitrid isolierten. In Versuchen mit Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnüren konnten sie so zeigen, dass das Absterben von Zellen durch diese Isolierung minimiert wird. Gleichzeitig konnte im oberen Teil der Spitze, wo Kontakt zu lebenden Zellen bestand, ein Signal abgeleitet oder induziert werden ^[32].

Eine Vorstrukturierung von MEAs für eine verbesserte Aktivität in neuronalen Netzwerken wurde von Chang et al. vorgestellt. Ihre Arbeiten konzentrierten sich auf mikrostrukturierte Stempel, die mit dem Protein Poly-D-Lysin (PDL) beschichtet waren. Diese Methode ermöglichte eine schnellere Synapsenausbreitung im neuronalen Netzwerk, so dass die Anzahl aktiver Elektroden auf den MEAs dadurch erhöht werden konnte ^[33].

Bei der Signableitung aus einzelnen Zellen treten ebenfalls häufig Probleme durch zu hohes Signalrauschen auf. Daher wird derzeit von vielen Gruppen eine weitergehende Miniaturisierung der Elektroden angestrebt, die das Interface zwischen Zellmembran und Elektrode optimieren soll. Dabei ist es vor allem wichtig, dass die Elektrode sich möglichst nah an der Zellmembran befindet um elektrische Signale mit besonders hohen Amplituden zu erhalten.

Neben den bisher vorgestellten Ansätzen zur Mikrostrukturierung wurden aufgrund der fortschreitenden Miniaturisierung von Elektroden inzwischen auch verschiedene Methoden zur Nanostrukturierung von Mikroelektroden entwickelt (s. Abb. 3.6). Das erste Beispiel ist die Arbeit von Wang et al. aus dem Jahr 2006 zur Herstellung von MEAs mit Carbon Nanotubes ^[34]. Diese Arrays wurden bereits erfolgreich als Interface für Neuronen aus dem Hippocampus eingesetzt. Zeitgleich arbeiteten Nguyen-Vu et al. mit Carbon Nanofibers, die zur mechanischen Stabilisierung mit Polypyrrol, einem elektrisch leitenden Polymer, ummantelt waren ^[35]. Hiermit wurde die Kopplung an Nebennierentumorzellen (kurz: PC12) untersucht. Erste metallische Nanostrukturen auf Mikroelektroden wurden von Yang et al. präsentiert. Durch die Modifikation mit Pt-Nanowires konnte das Signalrauschen der Elektroden bei Yang deutlich verringert werden. Gegenüber planaren Pt-Elektroden zeigten die Pt-Nanowire-Elektroden eine 50-fach erhöhte Messempfindlichkeit ^[36]. Zu einer ersten Anwendung kamen diese nanostrukturierten Elektroden bei der Detektion von Glucose in Blutproben.

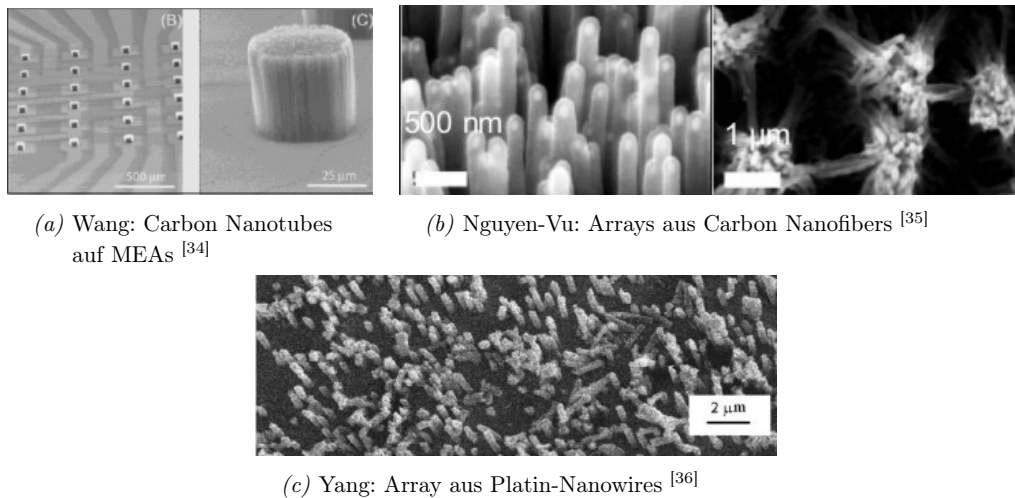


Abbildung 3.6: Verschiedene Ansätze zur Nanostrukturierung von Mikroelektroden

Eine Variante der chemischen Oberflächenmodifikation von MEAs wurde von Greve et al. vorgestellt. Greves Untersuchungen basierten auf verschiedenen Proteinbeschichtungen der Elektroden, die das Neuritenwachstum fördern und gleichzeitig den Abstand zwischen Zellmembran und Elektrode verringern sollten. Die Schnittstellen wurden mittels fokussiertem Ionenstrahl untersucht und führten zu dem Ergebnis, dass der Abstand zwi-

schen Zelle und Elektrode nur schwer über Proteinbeschichtungen zu steuern ist und nicht unbedingt zur gewünschten Verbesserung der Signalqualität führt [3].

Neben Mikroelektroden gibt es auch andere Möglichkeiten zur Ableitung extrazellulärer Signale wie z.B. Feldeffekttransistoren (FETs). Die Gruppe von Lieber stellte Transistor-Arrays aus Nanowires her (s. Abb. 3.7) und untersuchte mit diesen die Ausbreitung neuronaler Signale [37].

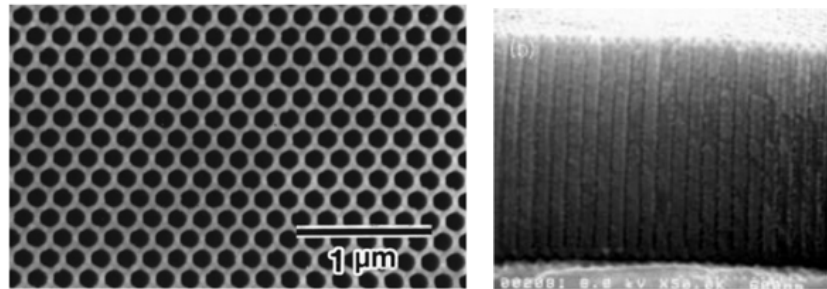


Abbildung 3.7: Transistor-Array von Lieber aus Nanowires [37]

3.3 Nanopillarherstellung in nanoporösen Aluminiumoxid-Membranen

Anodisierte Aluminiumoxid-Membranen (AAM) stellen ein weit verbreitetes Template-material zur Herstellung von Nanostruktur-Arrays dar. Sie können als Matrix für elektrochemische Deposition [38, 39], für fluidbasierte Methoden [40] sowie für Chemical oder Physical Vapor Deposition [41–43] (CVD bzw. PVD) dienen. Die Kontrolle der Prozessparameter während der Herstellung von AAM führt dabei zu gezielten Veränderungen in der Geometrie der Nanostrukturen.

In den 90er Jahren wurden von Masuda umfangreiche Untersuchungen zur Ausbildung von Nanoporen und deren Geometrie in AAM durchgeführt [44–46]. Für die Anodisierung, die zum selbstorganisierten Porenwachstum führt, werden in der Regel Oxal-, Schwefel- oder Phosphorsäure verwendet. Zu den Parametern, die den Anodisierungsprozess steuern, wie z.B. Säuretemperatur und -konzentration oder die Anodisierungsspannung, liegen bereits Studien an Aluminiumfolien vor [47, 48]. Auch für Aluminiumfilme auf unterschiedlichen Substraten, z.B. Silizium, wurde die Porenentstehung studiert [39, 49–52]. Die Poren wachsen senkrecht von der Oberfläche in die Aluminiumschicht hinein und organisieren sich während dieses Prozesses in einer hexagonalen Fernordnung (s. Abb. 3.8).



(a) REM-Aufnahme idealer hexagonaler Nanoporen in Al_2O_3 [46]

(b) Poren im Querschnitt [53]

Abbildung 3.8: Ideale hexagonale Nanoporen in Al_2O_3

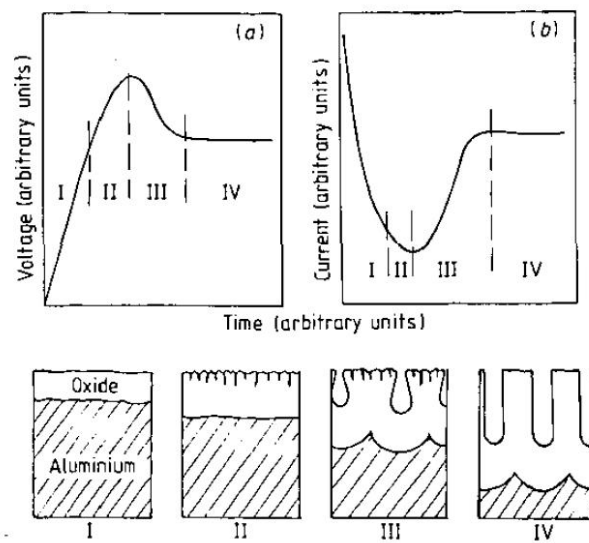


Abbildung 3.9: Vier Phasen des Porenwachstums in Al_2O_3 während der Anodisierung [54]

(a) $U(t)$ -Diagramm (b) $I(t)$ -Diagramm

Der Anodisierungsprozess lässt sich in vier Phasen unterteilen [54], die in Abb. 3.9 schematisch dargestellt sind. Während der ersten Sekunden nach Anlegen einer konstanten Spannung bildet sich eine isolierende Oxidschicht auf dem Aluminiumrand, der mit der

Säure in Kontakt ist (Phase I). In dieser Phase fällt der Strom rapide ab (s. Abb. 3.9(b)). Anschließend beginnt das Porenwachstum in Form von kleinen senkrechten Kanälen. In dieser Phase II sinkt der Strom nur noch geringfügig. Wenn sich die Poren in Phase III weiter in die Aluminiumschicht fortpflanzen, kommt es nach einem Minimum wieder zum Anstieg der Stromstärke. Die Poren entwickeln sich nun in einem stationären Prozess weiter, so dass der Strom in Phase IV einen konstanten Wert erreicht. Das Porenwachstum lässt sich bei konstantem Strom ebenso über den Spannungsverlauf (s. Abb. 3.9(a)) charakterisieren. Nach Abschluss der Porenentstehung ist am Boden noch eine Grenzschicht aus Aluminiumoxid vorhanden, die als „Barrier Layer“ bezeichnet wird. Die Barrier Layer lässt sich durch einen anschließenden Ätzschritt in Phosphorsäure entfernen, bei dem die Poren gleichzeitig erweitert werden ^[44].

Nach Untersuchungen von Parkhutik et al. im Jahr 1992 wird das Porenwachstum von zwei Prozessen kontrolliert ^[54], die in Abb. 3.10 dargestellt sind. Aufgrund von Feldverstärkungseffekten an der Grenzschicht zwischen Säure und Oxid wird die anfängliche Oxidschicht gelöst. Es wandern O^{2-} - und OH^- -Anionen durch die Oxidschicht und tragen zur Bildung neuer Oxidmoleküle an der Oxid-Metall-Grenzfläche bei. Gleichzeitig bewegen sich Al^{3+} -Kationen vom Metall durch das Oxid und gehen im Elektrolyt in Lösung. Sie sind nicht am Oxidationsprozess beteiligt, aber ihre Migration durch die Oxidschicht in den Elektrolyten trägt zur Bildung der porösen Strukturen bei ^[47, 54].

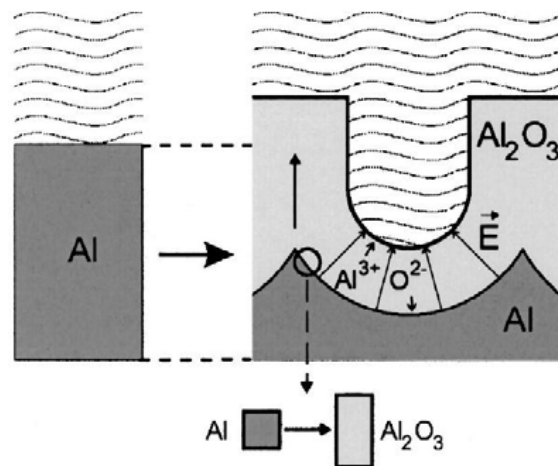


Abbildung 3.10: Prozesse während der Formation von Nanoporen in Al₂O₃ nach ^[47]

Während der Oxidbildung binden O^{2-} - Ionen an die Al-Atome aus dem Bulkmaterial. Da die Dichte von nanoporösem Aluminiumoxid niedriger ist als die von Aluminium ^[55], kommt es zu einer Volumenexpansion. Die einzig mögliche Ausdehnungsrichtung für das expandierende Oxid ist dann die vertikale Richtung. Aus diesem Grund werden bereits bestehende Porenwände weiter nach oben verschoben, und die charakteristische Kanalstruktur formiert sich.

Die Entstehung hexagonaler Porenstrukturen durch Selbstorganisation kann dadurch erklärt werden, dass für ideal angeordnete Poren das Verhältnis zwischen Porendurchmesser d_P und dem Abstand zweier Porenmittelpunkte d_{int} konstant ist ^[55]:

$$P = \frac{\pi}{2\sqrt{3}} \frac{d_P^2}{d_{int}^2} \quad (3.1)$$

d_{int} ergibt sich aus der Summe von Porendurchmesser d_P und dem Porenabstand x_p , wie in Abb. 3.11 schematisch dargestellt ist.

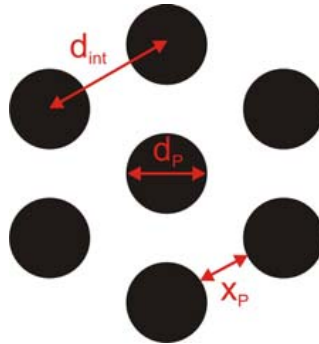


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der hexagonalen Porenstruktur in Al_2O_3
 d_{int} : Abstand zweier Porenmittelpunkte, d_P : Porendurchmesser,
 x_p : Porenabstand

Aus dieser Relation folgt dann die Porosität P , die unabhängig vom pH-Wert der verwendeten Säure ist. Die optimale Porosität, bei der es zu selbstorganisierter Porenentstehung kommt, liegt nach Studien von Gösele et al. bei 10 % ^[55]. d_{int} hängt dabei proportional von der Anodisierungsspannung U ab:

$$d_{int} = kU \quad (3.2)$$

Typische Spannungen für Oxalsäure sind 40 V, für Schwefelsäure 25 V und für Phosphorsäure 195 V ^[56]. Die Proportionalitätskonstante k beträgt dabei ca. $2,5 \frac{\text{mm}}{\text{V}}$ ^[55]. Außerdem gilt für den Abstand zwischen zwei benachbarten Porenmittelpunkten: $d_{\text{int}} = 2d_B$, wobei d_B die Höhe der Barrier Layer bezeichnet.

Der Porendurchmesser d_P hängt von der Säurekonzentration ab. Je niedriger der pH-Wert, d.h. je stärker die Säure ist, desto kleinere Poren können wachsen. In diesem Fall ist die Feldverstärkung am Porenboden besonders stark, so dass besonders viel Oxid in Lösung geht und sich die Poren damit überwiegend in vertikaler Richtung ausbreiten. Aus den Gleichungen 3.1 und 3.2 lässt sich dann unter Annahme der 10 %-Porositätsregel und bei gegebenem Porendurchmesser die Grenzspannung bestimmen zu ^[55]

$$U = \sqrt{\frac{\pi}{\sqrt{3}P}} \frac{d_p}{k} \quad (3.3)$$

3.4 Elektrochemische Methoden

Elektrochemische Methoden wie Zyklovoltametrie und Impedanzspektroskopie dienen als wertvolle Werkzeuge bei der Charakterisierung von Oberflächenprozessen an Elektroden.

3.4.1 Impedanzspektroskopie

Elektrochemische Prozesse beruhen auf verschiedenen Teilschritten, zu denen z.B. Stofftransport, Adsorptionsschritte oder Elektronendurchtritt gehören ^[57]. Diese Teilschritte tragen zur Strom-Spannungs-Charakteristik des Systems bei und werden zusätzlich zum ohmschen Elektrolytwiderstand R_E als Widerstände im System sichtbar. Fließt in diesem ein Wechselstrom, dann muß zwischen den frequenzunabhängigen ohmschen Widerständen und den frequenzabhängigen Wechselstromwiderständen unterschieden werden.

Sobald eine Metallelektrode in einen Elektrolyten eintaucht, bildet sich an der Grenzfläche zwischen Elektrodenoberfläche und Elektrolyt eine elektrische Doppelschicht aus. Ionen aus dem Elektrolyten lagern sich an der Oberfläche an, und Metallionen gehen in Lösung. So kommt es zum Aufbau einer Doppelschichtkapazität C_D aufgrund der Reaktion $\text{Red} \rightleftharpoons \text{Ox} + ne^-$. Legt man nun eine Gleichspannung an die Elektrode an, dann lädt sich

diese Doppelschicht auf, was eine Änderung des Potentials ϕ bewirkt. Für die Doppelschichtkapazität gilt dann mit der Ladung Q : $C_D = \frac{dQ}{d\phi}$. Handelt es sich beim angelegten Signal um eine Wechselspannung, dann hängt die Doppelschichtkapazität C_D nicht nur vom Elektrodenpotential sondern auch von der Frequenz des Signals ab ^[57].

Zur Bestimmung der frequenzabhängigen komplexen Widerstände dient die Impedanzspektroskopie (kurz: IS), die erstmals Ende der 80er Jahre zum Einsatz kam ^[41]. Inzwischen wird IS in vielen Bereichen für elektrochemische Systeme eingesetzt, u.a. in Korrosionsprozessen, für Elektrodeposition oder in Untersuchungen an Halbleiterelektroden und Polymerfilmen ^[58].

Für die Aufnahme von Impedanzspektren wird eine sinusförmige Wechselspannung $U(\omega)$ mit kleiner Amplitude und variierender Frequenz ω am Elektrolytsystem angelegt. Dabei wird die Stromantwort $I(\omega)$ aufgezeichnet, die dieselbe Frequenz wie $U(\omega)$ hat aber um die Phase α verschoben ist. Es gilt:

$$U(\omega) = \Re(U_0) \cdot \exp(i\omega t) \quad (3.4)$$

$$I(\omega) = \Re(I_0) \cdot \exp(i\omega t + \alpha) \quad (3.5)$$

Bei impedanzspektroskopischen Untersuchungen führt die Wechselspannung zu kinetisch kontrollierten elektrochemischen Reaktionen, die der Wechselstromfrequenz mit einer Phasenverschiebung α folgen und einen Ladungstransfer bedingen. Aus der Butler-Volmer-Gleichung, die die Durchtrittsstrom-Spannung-Beziehung im System beschreibt ^[57], lässt sich der ohmsche Durchtrittswiderstand R_D ableiten und nach Gleichung 3.6 berechnen. R ist hierbei die Gaskonstante, F die Faraday-Konstante und T die Temperatur. n bezeichnet die Ordnungszahl, und j_0 steht für die Stromdichte:

$$R_D = \frac{RT}{nFj_0} \quad (3.6)$$

Im Elektrolyten liegt außerdem ein diffusionsbedingter Konzentrationswiderstand Z_W vor, der frequenzabhängig ist und auch als Warburg-Impedanz bezeichnet wird. Z_W beruht auf der Geschwindigkeit des Massentransfers im System ^[58] und lässt sich darstellen als Reihenschaltung eines frequenzabhängigen Widerstandes R_K und eines kapazitiven Widerstandes $\frac{1}{\omega C}$ mit ebenfalls frequenzabhängiger Kapazität $C_K(\omega)$:

$$Z_W = R_K + \frac{1}{i\omega C_K} \quad (3.7)$$

Für $C_K(\omega)$ gilt mit D als Diffusionskonstante und der anfänglichen Stoffkonzentration c_0 nach [57]:

$$C_K(\omega) = \frac{n^2 F^2}{RT} \frac{c_0 \sqrt{2D}}{2\sqrt{\omega}} \quad (3.8)$$

Beide Widerstandsanteile in Gleichung 3.7 sind betragsgleich und gehen für $\omega \rightarrow \infty$ gegen 0. Anschaulich wechselt bei hohen Frequenzen die Reaktionsrichtung so schnell, dass die Diffusionsüberspannung verschwindet. In vielen realen elektrochemischen Systemen ist die Warburg-Impedanz sehr klein und wird daher in den folgenden Berechnungen vernachlässigt [59].

Das Ersatzschaltbild einer wechselstromdurchflossenen Elektrode mit diffusionsbestimmten Elektrodenreaktionen ist in Abb. 3.12 zu sehen. Neben der Doppelschichtkapazität C_D , dem Durchtrittswiderstand R_D und der Warburg-Impedanz Z_W , zu der R_K und C_K beitragen, ist hier auch der rein ohmsche Elektrolytwiderstand R_E eingezeichnet.

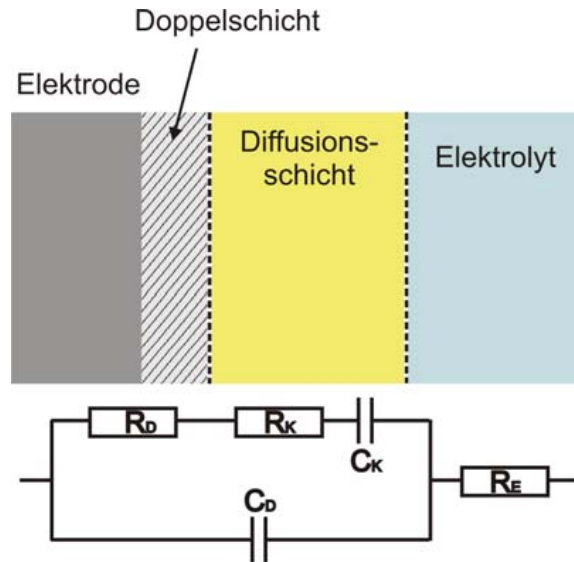


Abbildung 3.12: Wechselstrom-Ersatzschaltbild einer Halbzelle: Randles-Plot

Allgemein ist die Impedanz definiert über ^[60]:

$$Z = Z' + iZ'' = |Z| e^{i\alpha} \quad (3.9)$$

$$\frac{Z'}{Z''} = \cot(\alpha) \quad (3.10)$$

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} = \frac{U_m}{I_m} \quad (3.11)$$

Für die in Abb. 3.12 dargestellte Schaltung ergibt sich damit unter Berücksichtigung der parallel und in Reihe geschalteten Elemente folgende Gesamtimpedanz Z :

$$Z = R_E + Z_P \quad (3.12)$$

$$\text{mit} \quad \frac{1}{Z_P} = \frac{1}{R_D} + i\omega C_D. \quad (3.13)$$

Dieser Zusammenhang lässt sich umformen zu

$$Z = R_E + \frac{R_D - i\omega R_D^2 C_D}{1 + \omega^2 R_D^2 C_D^2} \quad (3.14)$$

mit den folgenden Real- und Imaginärteilen:

$$\Re = R_E + \frac{R_D}{1 + \omega^2 R_D^2 C_D^2} \quad (3.15)$$

$$|\Im| = -\frac{\omega R_D^2 C_D}{1 + \omega^2 R_D^2 C_D^2} \quad (3.16)$$

Wird der Imaginärteil der Impedanz in Abhängigkeit von ω gegen den Realteil aufgetragen, ergibt sich - ohne Berücksichtigung der Warburg-Impedanz - ein Halbkreis um $\Re = R_E + \frac{R_D}{2}$, wie er in Abb. 3.13 zu sehen ist. Diese Darstellung in der Gaußschen Zahlenebene wird Nyquist-Diagramm genannt. In diesem Diagramm lassen sich 3 Grenzfälle für ω ablesen ^[57].

$$\omega \rightarrow 0 : \Re = R_E + R_D; \quad |\Im| = 0 \quad (3.17)$$

$$\omega \rightarrow \infty : \Re = R_E; \quad |\Im| = 0 \quad (3.18)$$

$$\omega = \frac{1}{R_D C_D} : \Re = R_E + \frac{R_D}{2}; \quad |\Im| = \frac{R_D}{2} \quad (3.19)$$

Für hohe Frequenzen ω ist das System kinetisch kontrolliert, und der Halbkreis schneidet die x-Achse beim Elektrolytwiderstand R_E . Nähert sich die Frequenz dem Wert 0, dann lässt sich der Durchtrittswiderstand R_D aus dem zweiten Schnittpunkt mit der x-Achse bestimmen, der bei $R_E + R_D$ liegt.

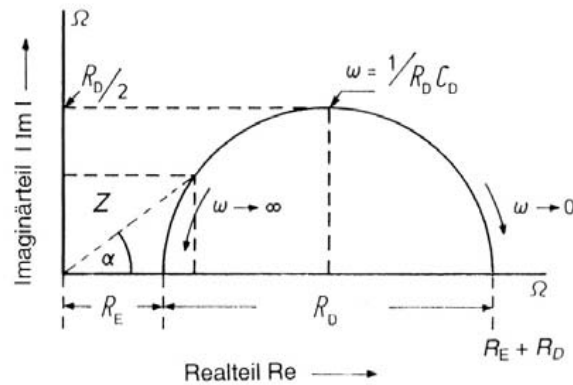


Abbildung 3.13: Nyquist-Diagramm: Ortskurve der Elektrodenimpedanz ^[57]

Wird auch die diffusionslimitierte Warburg-Impedanz im Modell berücksichtigt, ergibt sich ein Nyquist-Diagramm mit Impedanzanteilen aus Durchtritts- und Diffusionhemmung, wie es in Abb. 3.14 dargestellt ist.

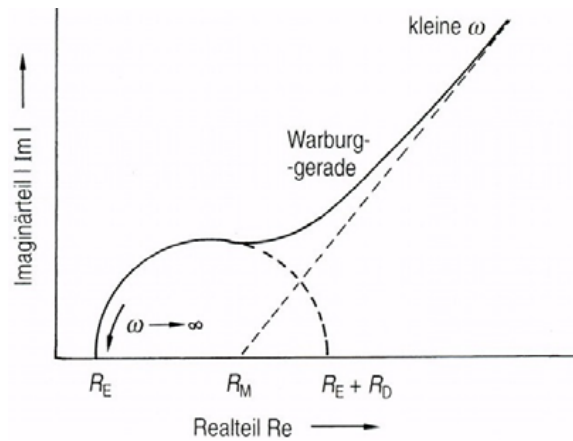


Abbildung 3.14: Darstellung der Warburg-Impedanz im Nyquist-Plot für ein System, das durchtritts- und diffusionslimitiert ist ^[57]

Dort ist zu erkennen, dass der Halbkreis für kleine Frequenzen ω nicht mehr die x-Achse schneidet sondern dass sich hier mit dem Phasenwinkel $\alpha = 45^\circ$ eine Gerade an den Halbkreis anschließt. Von der kinetischen Kontrolle bei hohen Frequenzen geht das System im niederfrequenten Bereich in ein diffusionskontrolliertes System über. Verlängert man die Warburggerade bis zur x-Achse, ergibt sich ein Schnittpunkt bei R_M , der sich wie folgt berechnen lässt ^[61]: $R_M = R_E + R_D - 2\sigma C_D$. σ enthält neben der Gas- und der Faraday-Konstante auch noch diffusions-, temperatur- und konzentrationsabhängige Faktoren, die zu R_M beitragen ^[59, 61].

Eine Alternative zur Auswertung der Daten in der komplexenen Ebene stellt das Bode-Diagramm dar (s. Abb. 3.15), in dem $\lg |\Im|$ und der Phasenwinkel α in Abhängigkeit von $\lg(\omega)$ dargestellt werden. Aus dieser frequenzabhängigen Darstellung kann die Anzahl der einzelnen Elemente abgelesen werden, die zur Gesamtimpedanz beitragen ^[62]. Für die Frequenz α gilt:

$$\tan \alpha = \frac{|\Im|}{\Re} \Rightarrow \alpha = \arctan \left(\frac{|\Im|}{\Re} \right) \quad (3.20)$$

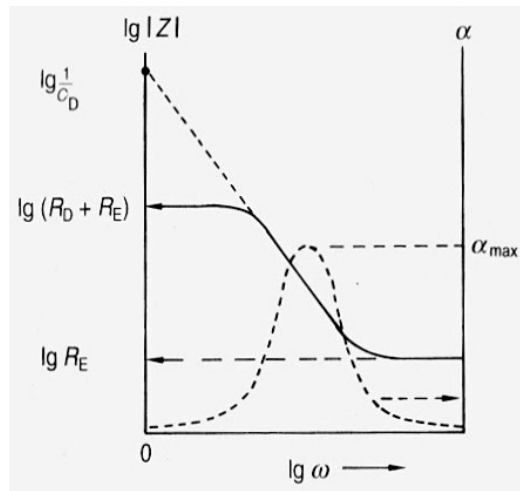


Abbildung 3.15: Bode-Plot: frequenzabhängige Darstellung der Impedanz ohne Berücksichtigung der Warburg-Impedanz ^[57]

Im Bereich hoher Frequenzen kann man dem Bode-Plot entnehmen, dass sich das Verhalten des Ersatzschaltbildes aus Abb. 3.12 dem rein ohmschen Elektrolytwiderstand R_E

annähert, da die Phase α hier gleich null ist. Im mittleren Frequenzbereich verläuft $\lg |Z|$ als Gerade mit konstanter Steigung. Wird diese Gerade bis zur y-Achse extrapoliert, so kann man aus dem Schnittpunkt $\lg(\frac{1}{C_D})$ die Doppelschichtkapazität C_D bestimmen. In diesem Bereich erreicht α sein Maximum. Aus dem zu α_{max} gehörenden Frequenzwert lassen sich dann über Relation 3.21 die Größen C_D , R_D und R_E ermitteln. Für niedrige Frequenzen erreicht der Impedanzgang den Wert $\lg(R_D + R_E)$, und die Phase sinkt wieder auf den Wert null.

$$\omega(\alpha_{max}) = \frac{1}{R_D C_D} \sqrt{1 + R_D R_E} \quad (3.21)$$

3.4.2 Zyklovoltametrie

Zyklovoltametrische Untersuchungen dienen häufig als erste Studie, um in einem elektrochemischen System die Potenzialregion mit der interessierenden Elektrodenaktivität zu ermitteln. Hervorgegangen ist die Zyklovoltametrie aus der Polarographie, die 1922 von Heyrovsky entwickelt wurde [59].

Mit zyklovoltametrischen Messungen können zwei Arten von Elektrodenprozessen untersucht werden. Die erste Art stellen Faradayprozesse dar, bei denen der Ladungstransfer dem Faradaygesetz unterliegt. In diesem Fall ist die Masse m eines Stoffes, die an einer Elektrode umgesetzt wird, proportional zur Ladungsmenge Q . Hierbei kommt es durch die Potenzialvariation zu einem Ladungsaustausch an der Phasengrenze zwischen Metall und Elektrolyt. Während dieses Transfers wird die Elektrodenoberfläche oxidiert bzw. reduziert [57]. Bei Prozessen, die nicht dem Faradaygesetz unterliegen, findet kein Ladungsaustausch zwischen Elektrode und Elektrolyt statt, sondern es kommt lediglich zu einer lokalen Änderung der Elektrolytzusammensetzung.

Für zyklovoltametrische Messungen wird eine Dreielektrodenanordnung, bestehend aus Arbeits-, Gegen- und einer nicht polarisierten Referenzelektrode, verwendet. In dieser Anordnung wird ein zyklisch veränderliches Dreieckspotenzial $E(t)$ angelegt, weshalb diese Methode auch als Dreiecksspannungsmethode bezeichnet wird [57] (s. Abb. 3.16). Zunächst erfolgt ein linearer Potenzialvorschub bis zu einem positiven Umkehrpotenzial E_t^+ . Zur Vervollständigung des Potenzialzyklus wird der Vorschub dann umgekehrt, und das Potenzial wird bis zum negativen Umkehrpotenzial E_t^- linear abgesenkt. Während der Potenzialvariation wird die Stromänderung $I(E(t))$ zwischen Arbeits- und Gegenelektrode über einen Potentiostaten gemessen. Die Spannungsmessung erfolgt zwischen Arbeits-

und Referenzelektrode. Dabei ist der ohmsche Spannungsabfall zwischen Arbeits- und Gegenelektrode vernachlässigbar klein.

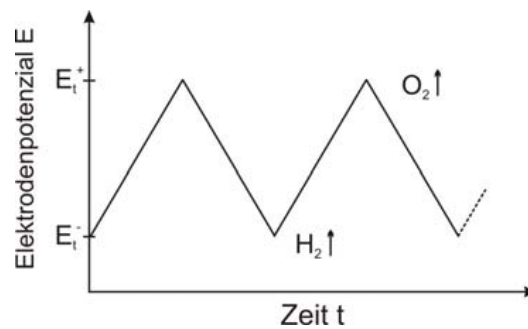


Abbildung 3.16: Dreiecksspannung zur Aufnahme von Zyklovoltammogrammen

Das maximale negative und positive Umkehrpotential werden bestimmt durch die Zersetzung des Elektrolyten. Im Fall eines wässrigen Elektrolyten liegen sie häufig zwischen der H_2 - und der O_2 -Entwicklung. Dies führt dazu, dass sich die Elektrode automatisch aktiviert: Verunreinigungen, die aus der Lösung adsorbiert worden sind, können die Elektrodenprozesse durch Blockierung aktiver Oberflächenzentren stören. Sie können durch Reduktion bzw. Oxidation entfernt werden. Wenn im Elektrolyten keine redoxaktiven Stoffe vorhanden sind, die zwischen den beiden Umkehrpotentialen elektrolytisch umgesetzt werden, sind die Ströme ausschließlich auf den Auf- und Abbau von Wasserstoff- und Sauerstoff-Chemisorptionsschichten in Form von Deckschichten auf der Elektrode zurückzuführen. Ein Standardbeispiel hierfür stellt das Zyklovoltammogramm einer Platinelektrode in 1 M KOH dar, das in Abb. 3.17 gezeigt ist. Das Deckschichtdiagramm wurde unter Spülung mit Stickstoff bei einer Scangeschwindigkeit von $100 \frac{mV}{s}$ aufgenommen. Die Deckschichtstromdichte ist proportional zur Scangeschwindigkeit v , und über Gleichung 3.22 lässt sich mit der Stromdichte j die Doppelschichtkapazität C_D bestimmen:

$$C_D = \frac{\Delta j}{2v} \quad (3.22)$$

Die Relation gilt bis zu einer Scangeschwindigkeit von $v \leq 500 \frac{mV}{s}$. Oberhalb dieser Geschwindigkeit ist die Proportionalität nicht mehr gegeben, da j dann langsamer ansteigt [57].

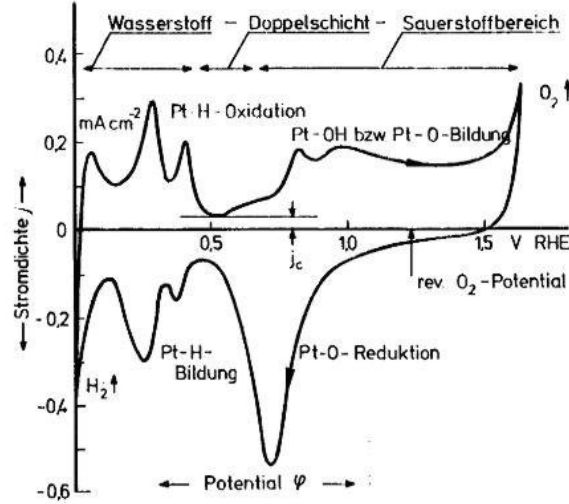


Abbildung 3.17: Zyklovoltammogramm einer Platinelektrode in 1 M KOH, gespült mit N_2 [57]. Die Stromdichte ist hierbei ausschließlich auf den Auf- und Abbau von Wasserstoff- und Sauerstoffdeckschichten zurückzuführen.

Wenn redoxaktive Substanzen im Elektrolyten vorhanden sind, wird die entsprechende Strom-Spannungs-Charakteristik diesen Deckschichtströmen überlagert. Ein typisches Voltammogramm eines solchen reversiblen Redoxsystems ist in Abb. 3.18 dargestellt. Hierbei erfolgt der Massentransport diffusionslimitiert. Durch die Erhöhung des Elektrodenpotenzials kommt es zu einem Überpotenzial an der Phasengrenze. Dieses Überpotenzial bedingt einen faradayschen Elektronentransfer, der im Voltammogramm als exponentieller Stromanstieg zu erkennen ist.

Der zeitabhängige Stromverlauf in diesem System kann mit der Faraday-Konstante F , der Fläche A , der Diffusionskonstante D und der anfänglichen Oberflächenkonzentration c_0 beschrieben werden durch die Cottrell-Gleichung [58]:

$$I(t) = I_d(t) = \frac{nFAc_0\sqrt{D}}{\sqrt{\pi t}} \quad (3.23)$$

Nach und nach verarmt die redoxaktive Substanz an der Elektrode. Gleichzeitig verbreitert sich die Dicke δ_N der Diffusionsschicht, wodurch die Diffusionslimitierung im System

sichtbar wird. Für steigendes Potenzial limitiert der Massentransfer den Strom auf den Wert $\frac{nFDc_0}{\delta_N}$. Ab diesem Punkt nimmt der Strom wieder ab, bis das Umkehrpotenzial E_t^+ erreicht ist, da die Dicke der Diffusionsschicht mit der Zeit zunimmt: $\delta_N = \sqrt{\pi Dt}$.

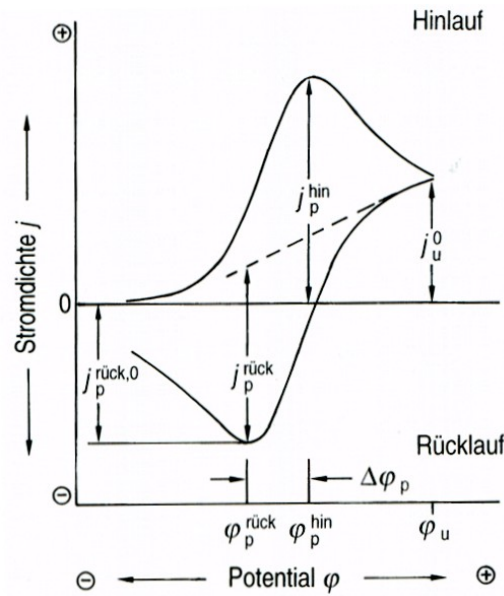


Abbildung 3.18: Typisches Zyklovoltammogramm eines reversiblen Redoxsystems ^[57]

Unter der Annahme reversibler Elektrodenprozesse und gleicher Diffusionskoeffizienten für die oxidierte und die reduzierte Substanz kann vorausgesetzt werden, dass für die Peakstromdichten gilt: $j_p^{hin} = j_p^{rueck}$. Aus den gleich hohen Peakströmen kann dann die Menge der reduzierten bzw. oxidierten Spezies an der jeweiligen Elektrode berechnet werden. Als Basislinie zur Ermittlung der Peakhöhen dient nun nicht mehr die x-Achse. Für den negativen Potentialscan kann in guter Näherung als Basislinie eine Linie angenommen werden, die am negativen Umkehrpotenzial E_t^- beginnt und den ersten Bereich der Stromkurve im negativen Scan fittet ^[57]. Wenn die Scangeschwindigkeit v erhöht wird, tritt der Peak mit einer höheren Stromdichte auf. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass bei höheren Geschwindigkeiten in einer gegebenen Zeit höhere Potenziale erreicht werden. Da die Diffusionslimitierung unabhängig von v ist, kommt es dann zur Erhöhung der Peakstromdichte ^[59].

3.4.3 Elektrochemische Untersuchungen an Nanostrukturen

Aufgrund ihrer geringen Abmessungen ermöglichen metallische Nanostrukturen und Carbon Nanotubes (CNT) die Untersuchung von elektrochemischen Reaktionen mit sehr schnellem Elektronentransfer ^[63]. An Nanoelektroden dominieren in zunehmendem Maß radiale Diffusionseffekte, die einen schnelleren Massentransfer bedingen. Dadurch wird der Elektronentransfer im Elektrolyten weniger stark durch den Massentransfer limitiert ^[64]. Aufgrund der zunehmenden Miniaturisierung von Elektroden bis hin zur Größenordnung der Doppelschicht unterscheidet sich deren Verhalten deutlich von größeren Elektroden. Daher sind Nanoelektroden in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus elektrochemischer Studien gerückt. Zur Charakterisierung wurden Zyklovoltametrie und Impedanzspektroskopie verwendet, um den Teil der Elektrodenoberfläche zu bestimmen, der an der jeweiligen Reaktion beteiligt war. Im folgenden wird diese Fläche als elektroaktiv bezeichnet. Die ermittelte elektroaktive Fläche wurde dann der geometrischen Fläche der Nanostrukturen gegenübergestellt.

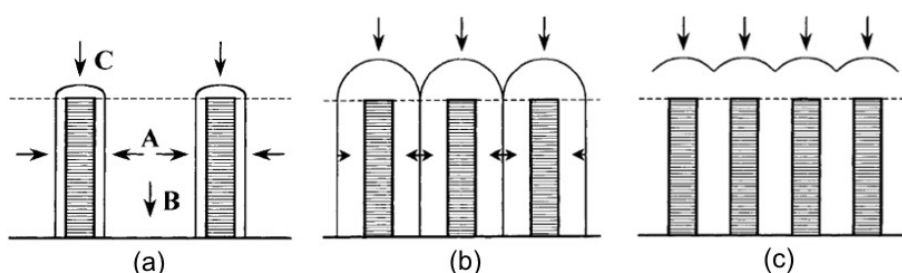


Abbildung 3.19: Verschiedene Diffusionsverhältnisse an Nanopillar-Arrays ^[65]

(a) Nichtlineare, zylindrische Diffusion

(b) Eindimensionale Diffusion mit Anteilen aus nichtlinearer Diffusion

(c) Eindimensionale Diffusion

Forrer et al. zeigten im Jahr 2000 mittels Zyklovoltametrie an Gold-Nanowire-Arrays mit dem Redoxpaar $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, dass aufgrund der Oberflächenvergrößerung durch die Nanostrukturen hohe kapazitive Ströme im Elektrolyten auftreten ^[65]. Gleichzeitig kam es aber bereits am Anfang der Reaktion zu einer Verarmung des Redoxpaares in den Elektrolytbereichen zwischen den Nanowires. Der diffusionsbedingte Ladungstransfer der faradayschen Reaktion fand laut Forrer nur an den Spitzen der Nanowires statt, wie das Modell in Abb. 3.19(c) zeigt. Diese eindimensionale Diffusion tritt nur für kurze

Zeitintervalle auf. Bei längeren Reaktionszeiten geht sie in eine hemisphärische Diffusion über.

Liegt allerdings keine Überlagerung der Diffusionsbereiche zwischen den einzelnen Nanostrukturen vor (s. Abb. 3.19(a)), so findet die Diffusion auch zwischen den Nanowires in alle Richtungen statt, und man spricht von nichtlinearer zylindrischer Diffusion. Treffen die beiden Diffusionsbereiche gerade aufeinander, so wie in Abb. 3.19(b) dargestellt, findet die Diffusion entlang dieser Grenzfläche statt, und eindimensionale und nichtlineare Diffusion überlagern sich. Welcher Diffusionsfall eintritt, hängt dabei von der Geometrie der Nanowire-Arrays und der Scangeschwindigkeit ab. In Forrers Experimenten hatten die Nanostrukturen einen Durchmesser von ca. 80 nm, und die Länge variierte zwischen 100 nm und 800 nm. Aufgrund dieser Geometrie wurde für Forrers untersuchte Nanostrukturen ein Verhältnis zwischen faradayschen und kapazitiven Strömen beobachtet, das gegenüber dem Verhältnis an planaren Goldelektroden deutlich verringert war. Die mittels Zyklovoltametrie bestimmte Oberflächenvergrößerung betrug bei Forrer et al. ungefähr 90. Allerdings wurden keine vergleichenden Methoden verwendet.

Eine spätere Studie zu den elektrochemischen Eigenschaften von metallischen Nanostrukturen wurde von Anandan et al. durchgeführt ^[66]. Diese Gruppe beobachtete in zykovoltametrischen Experimenten an Nanopillar-Arrays eine Vergrößerung der elektroaktiven Fläche um den Faktor 38. Zusätzlich führte Anandan REM-Messungen der Arrays durch, die eine 12-fache Vergrößerung der elektroaktiven Fläche ergaben. Die verwendeten Nanopillars hatten Höhen bis zu 4,5 μm und einen Durchmesser von 100 nm. Der deutliche Unterschied zwischen den beiden Messmethoden wurde auf die Vermutung zurückgeführt, dass der Ladestrom in der Doppelschicht, wie er in der von Forrer verwendeten Gleichung 3.22 auftritt, kein geeigneter Parameter zur Bestimmung der elektroaktiven Oberfläche von Nanostrukturen ist. Dies begründeten Anandan et al. damit, dass die Doppelschichtkapazität C_D unabhängig von der angelegten Spannung ist ^[58] und schlossen hieraus, dass der im REM ermittelte Faktor 12 die Oberflächenvergrößerung am realistischsten beschreibt. Abschließend zeigten sie, dass die Peakströme der Redox-Reaktion an Nanopillars linear von der Wurzel der Scangeschwindigkeit abhängen. Dies implizierte lineare Diffusionsmechanismen an den untersuchten Nanopillar-Arrays.

Yang et al. studierten das elektrochemische Verhalten von Nanoelektroden-Arrays (NEAs) aus Platin für den Einsatz als Biosensoren ^[36]. Die einzelnen Pt-Nanowires waren 2 μm hoch und hatten einen Durchmesser von 250 nm. Aus zykovoltametrischen Untersuchungen der NEAs schlossen sie, dass die elektroaktive Oberfläche der NEAs gegenüber pla-

narem Platin sechsfach vergrößert war. Ferner wiesen sie eine Erhöhung der Sensitivität durch Platin-NEAs um den Faktor 50 nach. Mit diesen Daten belegten sie die vermutete Senkung des Signalrauschens und ein erhöhtes Detektionslimit der Platin-NEAs.

3.5 Zellwachstum auf Substraten

3.5.1 Aufbau und Funktionsweise von Zellen

Eine Zelle ist die kleinste lebens- und vermehrungsfähige Einheit aller Lebewesen und ist im Durchschnitt 1 bis 100 μm groß. Es wird unterschieden zwischen prokaryotischen Zellen ohne Zellkern und eukaryotischen Zellen, die einen Zellkern besitzen [67]. Jede Zelle ist von einer Plasmamembran umgeben, die aus einer Doppellipidschicht und verschiedenen Proteinen besteht. Eine solche Membran ist zwischen 6 und 10 nm dick und hält das Milieu im Innern der Zelle aufrecht [68, 69]. Innen- und Außenseite der Zellmembran sind hydrophil, die Mitte der Zellwand ist dagegen hydrophob (s. Abb. 3.20(a)).

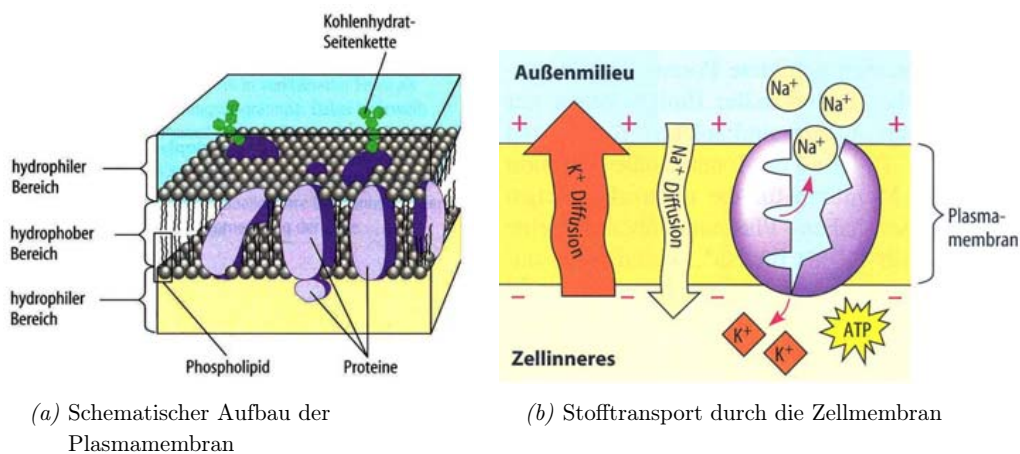


Abbildung 3.20: Plasmamembran einer Zelle [67]

Die Außenseite ist mit verschiedenen Rezeptoren besetzt, und in der Zellmembran selber befinden sich Ionenkanäle und -pumpen, durch die ein Ionenaustausch zwischen Zelle

und Umgebung stattfindet. Ursache für diesen Stofftransport ist das zeitlich veränderliche Membranpotenzial. Weicht dieses Potenzial kurzzeitig vom Ruhepotenzial der Zelle ab, kommt es zur elektrischen Erregung in Form eines Aktionspotenzials. Dieses elektrische Signal wird verursacht durch einen Natriumeinstrom in die Zelle und einen verzögerten Kaliumausstrom (s. Abb. 3.20(b)). Durch diesen Ionenaustausch werden u.a. die Erregungsleitung von Nerven und die Kontraktion von Muskeln gesteuert.

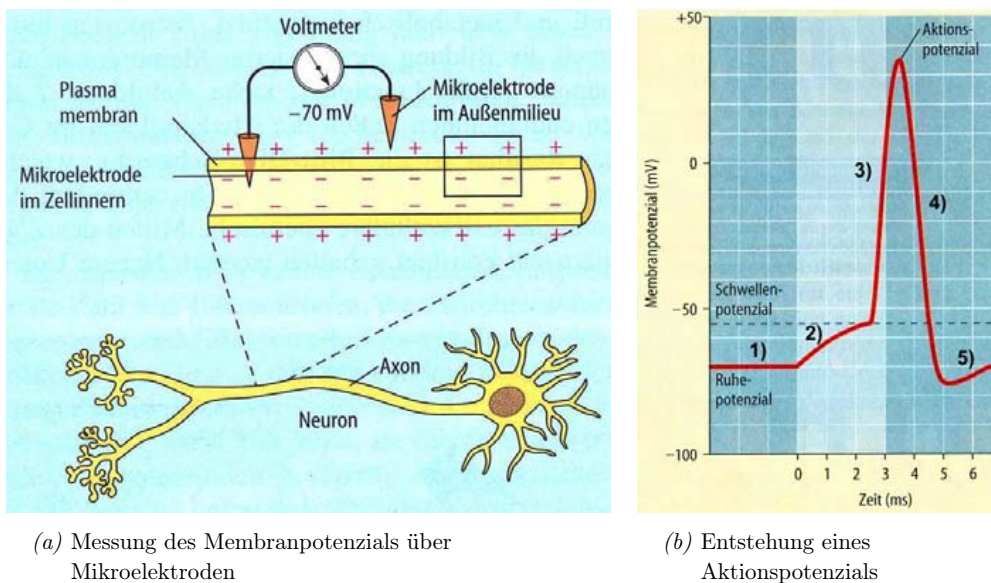


Abbildung 3.21: Veränderung des Membranpotenzials an einem Neuron ^[67]

Durch elektrophysiologische Methoden kann das Membranpotenzial mit Mikroelektroden gemessen werden (s. Abb. 3.21(a)). Dabei wird eine Elektrode in die Zelle eingestochen, und eine Referenzelektrode befindet sich außerhalb. Für ein Neuron im Ruhezustand beträgt das Ruhepotenzial normalerweise -70 mV ^[67]. Nerven- und Muskelzellen haben die Fähigkeit, ihr Membranpotenzial aktiv zu verändern, weswegen sie auch als erregbare oder elektroaktive Zellen bezeichnet werden. Damit sich ein Aktionspotenzial als Signal in einem neuronalen Netzwerk ausbreiten kann, wird es entlang eines Axons weitergeleitet. Dabei baut es sich immer wieder sequenziell auf. Die Entstehung eines Aktionspotenzials lässt sich in unterschiedliche Phasen unterteilen, die in Abb. 3.21(b) dargestellt sind:

1. Im Ruhezustand des Neurons sind die Natrium- und Kaliumkanäle der Zellmembran geschlossen.
2. Durch einen äußeren Reiz werden die Natriumkanäle geöffnet. Wenn durch den Einstrom von Na^+ -Ionen das Schwellenpotenzial erreicht wird, kommt es zur Auslösung eines Aktionspotenzials.
3. In der Depolarisationsphase des Aktionspotenzials strömen weiter Na^+ -Ionen in das Zellinnere, jedoch sind die Kaliumkanäle weiterhin geschlossen. Dadurch wird das Zellinnere zunehmend positiv geladen.
4. Die Natriumkanäle schließen sich wieder in der Repolarisationsphase des Aktionspotenzials. Gleichzeitig öffnen sich die Kaliumkanäle, wodurch das Zellinnere nun wieder negativ wird.
5. Auch nach vollständiger Repolarisation bleiben die Kaliumkanäle wegen des trägen Verhaltens der Ionenkanäle noch kurze Zeit geöffnet, und es kommt zur Hyperpolarisierung. Ist diese abgeklungen, befindet sich das Neuron wieder im Ruhezustand und ist bereit für die nächste Reizweiterleitung.

Das Membranpotenzial einer Zelle kann anhand der bestehenden Ionenkonzentrationen und der Durchlässigkeit der Zellmembran für die jeweiligen Ionen mit der Goldman-Gleichung berechnet werden ^[70]:

$$V_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{out} + P_{Na}[Na^+]_{out} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{out}} \quad (3.24)$$

R ist die Gaskonstante, F steht für die Faraday-Konstante, T bezeichnet die Temperatur, und P steht für die ionischen Permeabilitäten. Die eckigen Klammern kennzeichnen die jeweiligen Ionenkonzentrationen. Aus der Goldman-Gleichung lässt sich ablesen, dass eine hohe Permeabilität und Konzentration eines spezifischen Ions dazu führen, dass dieser Ionentyp das Membranpotenzial V_M entscheidend beeinflusst. Ist die Permeabilität eines Ionentyps gegenüber den anderen besonders hoch, z.B. wenn $P_K \gg P_{Na}$ oder P_{Cl} ist, dann geht die Goldman-Gleichung in die Nernst-Gleichung über:

$$V_M \cong \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_{out}}{[K^+]_{in}} \quad (3.25)$$

Ein weiterer wichtiger Bestandteil einer Zelle ist das Zytoskelett, das mit der Plasmamembran in vielseitiger Wechselbeziehung steht ^[69]. Das Zytoskelett besteht aus drei Klassen von Filamenten, die wiederum aus Proteinen zusammengesetzt sind. Zu diesen Filamenten gehören Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Insgesamt trägt das Zytoskelett zur Elastizität, der äußeren Form und der mechanischen Stabilität der Zelle bei. Außerdem hat das Zytoskelett eine sensorische Funktion und spielt eine wesentliche Rolle in der Zellbewegung und der Zellteilung ^[67].

Umgeben ist die Plasmamembran von der extrazellulären Matrix (ECM, extracellular matrix), einem komplexen Geflecht aus Glykoproteinen, die von der Zelle abgesondert werden. Die ECM ist ebenfalls wichtig für die Fortbewegung von Zellen, da sie als Hauptbestandteil das faserförmige Protein Kollagen enthält, das die Zellausrichtung beeinflusst. Für die Elastizität der ECM sind Proteinfasern aus Elastin verantwortlich ^[71]. Zu den adhäsiven Glykoproteinen, die die Zelle an die ECM binden, gehört z.B. das Adhäsionsprotein Fibronectin, das gleichzeitig die Wegfindung bei der Zellwanderung unterstützt. Die spezialisierten Kontaktstellen zwischen Zelle und ECM oder auch zwischen benachbarten Zellen werden als Junctions bezeichnet. Durch Junctions werden Zellen zu höheren Struktur- und Funktionseinheiten miteinander verknüpft, und auch die Zellkommunikation wird durch diese Kontakte ermöglicht ^[72].

Die ECM und das Zytoskelett einer Zelle sind dazu in der Lage sich gegenseitig in ihrer Ordnung zu beeinflussen. Einerseits kann das Zytoskelett über die Aktinfilamente Kräfte ausüben, die zur Ausrichtung der Makromoleküle in der ECM führen. Gleichmaßen können diese Makromoleküle aber auch das Zytoskelett der Zellen strukturieren, mit denen sie über die Junctions verbunden sind. Der wechselseitige Ordnungsvorgang zwischen Zelle und ECM wird dabei durch Integrine reguliert. Dies sind Rezeptoren, die als Verbindungsglieder zwischen ECM und Aktinzytoskelett wirken. Damit sind Integrine verantwortlich für Wachstum und Überleben sowie für Form und Fortbewegung einer Zelle ^[71].

An der Fortbewegung von Zellen auf Substraten, die der Wanderung von Amöben gleicht, sind verschiedene Prozesse beteiligt (s. Abb. 3.22). Am sogenannten Leitsaum der Zelle bilden sich flächige Lamellipodien und stielförmige Filopodien aus. Die Filopodien tasten das Umfeld auf chemische Reize hin ab, die anderen Fortsätze schieben die Zelle voran. Dabei werden sie durch die Polymerisation von Aktin (blau gekennzeichnet) unterstützt.

Die Aktinfilamente in den Stressfasern und im Leitsaum bestimmen die Dynamik der Zellfortsätze. Im rückwärtigen Teil der Zelle befindet sich der Zellkern, und die Zellmembran ist dort mechanisch durch Aktomyosin verstärkt (grün markiert). Über Fokalkontakte haftet die Zelle reversibel auf dem Substrat. Es wird vermutet, dass ein Anstieg der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration diese Kontakte vom Substrat lösen kann, wodurch die Fortbewegung ermöglicht wird. Außerdem soll die (De-)Phosphorylierung von Proteinen entscheidend an der Haftung von Zellen auf Substraten beteiligt sein ^[73]. Auch in der Ausbildung neuronaler Netzwerke wurden amöboide Suchbewegungen der feinen Neuronenfortsätze beobachtet. Diese Bewegungen gehen von sogenannten Wachstumskegeln aus, die zum Mikrofilamentsystem der wachsenden Neuronen gehören.

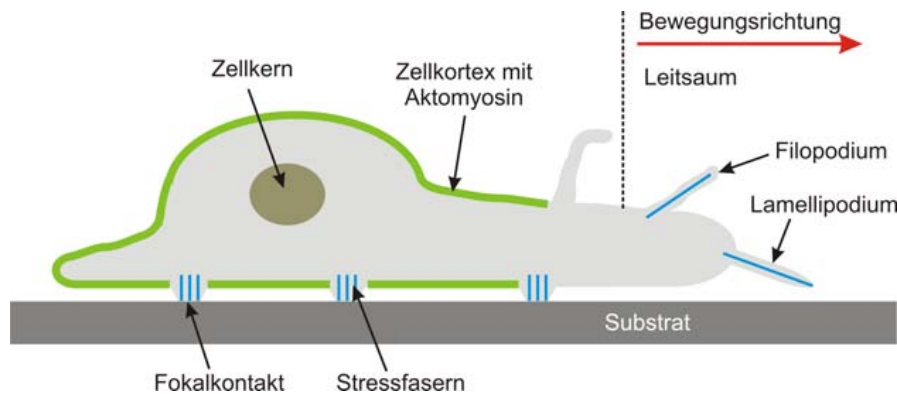


Abbildung 3.22: Bewegung einer Zelle auf einem Substrat mit den daran beteiligten Zellkompartimenten, nach ^[73]

3.5.2 Zellwachstum auf mikro- und nanostrukturierten Substraten

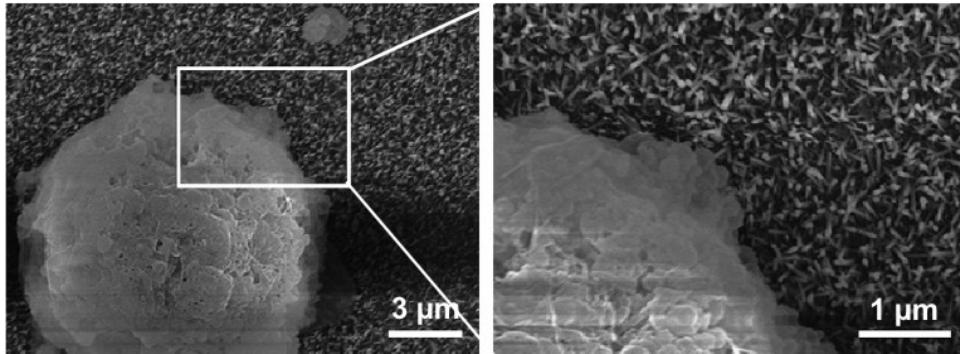
Der Entwicklungsprozess von Zellen ist stark abhängig vom Substrat, auf dem sie wachsen. Neben Adhäsion und Zellausrichtung wird auch die Zellmorphologie maßgeblich durch die Struktur des Substrates beeinflusst, mit dem die Zellen in Kontakt stehen. Zum Wachstum unterschiedlicher Zelltypen auf mikrostrukturierten Substraten wurden in den späten 90er Jahren bereits zahlreiche Studien durchgeführt ^[74, 75]. Durch den zunehmenden Trend der Miniaturisierung in der Strukturierung von Oberflächen haben sich Techniken wie Elektronenstrahl-Lithographie, Nanoimprinting oder selbstorganisierte Prozesse eta-

bliert, die die Herstellung von nanostrukturierten Substraten ermöglichen. Die Wechselwirkung zwischen verschiedenen Zelltypen und nanostrukturierten Substraten aus unterschiedlichen Materialien ist inzwischen Gegenstand vieler Studien. Diese Untersuchungen zeigen, dass Nanostrukturen einen deutlichen Einfluss auf die Struktur des Zytoskeletts, die adhärierte Zellfläche und die Ausbildung von Adhäsionspunkten auf dem Substrat haben sowie auf die Zellorientierung und -bewegung ^[76]. Es wird vermutet, dass es aufgrund der Nanostrukturen zu lokalen Änderungen in den Kräften kommt, die zwischen Zelle und Substrat herrschen. Dabei könnten die Filopodien den Zellen helfen, das nanostrukturierte Substrat abzutasten, jedoch ist dieser Mechanismus noch unklar. Während mikrostrukturierte Oberflächen hauptsächlich die Zellform beeinflussen, scheinen Nanostrukturen vielmehr zur Regulierung von kollektiven Zellfunktionen beizutragen ^[77].

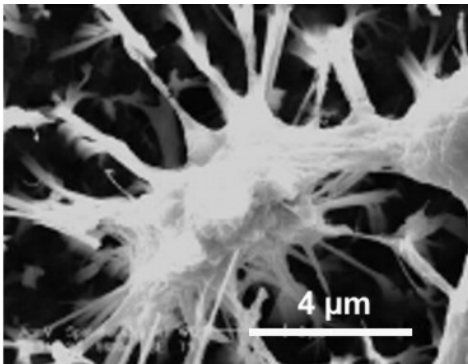
Inzwischen wurde eine Vielzahl von Zelltypen auf unterschiedlichen Nanostrukturen untersucht. Teixeira et al. studierten die Zellorientierung menschlicher Hornhaut-Epithelzellen auf Siliziumwafern mit Nanorillen. Sie fanden deutliche Wechsel in der Zellausrichtung in Abhängigkeit von den Rillenabständen und -breiten sowie von externen Faktoren ^[78–80]. Untersuchungen an Fibroblasten auf Polystyren-Nanorillen wurden von Loesberg durchgeführt ^[81]. Die Analyse der Zellausrichtung auf diesen Oberflächen ergab, dass für Nanorillen, die schmaler als 35 nm waren, keine Ausrichtung der Fibroblasten über Kontaktpunkte mehr stattfand. Studien von Curtis et al. zum Wachstum von Fibroblasten auf Arrays aus Quarzsäulen zeigten, dass die Zelladhäsion und -beweglichkeit auf diesen geordneten Strukturen verringert wurden ^[82]. Beide Größen hingen deutlich von Durchmesser und Abstand der Quarzsäulen ab.

Von Huang et al. wurde eine Nanostrukturierung mit Integrin-spezifischen Peptiden auf bioinerten Polyethylenglykol-Substraten vorgestellt ^[83]. Diese Strukturierung führte dazu, dass Osteoblasten darauf eine deutlich reduzierte Zelladhäsion zeigten, sobald der Abstand zwischen den Strukturen 70 nm überschritt. Eine Studie von Lee et al. zum Wachstum von Fibroblasten und verschiedenen Endothelzellen auf Nanostäben aus Zinkoxid (ZnO) zeigte ebenfalls eine stark verminderte Adhäsion der Zellen auf den Nanostrukturen gegenüber planarem ZnO. Überdies waren die wenigen adhärierten Zellen nicht überlebensfähig, da keine Fokalkontakte, Stressfasern und Lamellopodien auf den Nanostäben gebildet werden konnten, wie Abb. 3.23(a) zeigt ^[84].

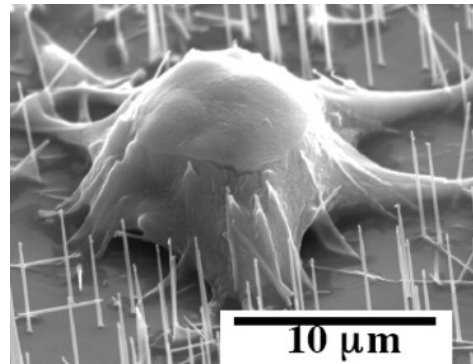
Auch für Neuronen auf Nanostrukturen aus Polymethylmethacrylat (PMMA), die mittels Nanoimprinting hergestellt wurden, liegen bereits Untersuchungen von Johansson et al. vor. Hierbei zeigte sich zum einen, dass Neuronen ein Wachstum an Kanten und auf



(a) Fibroblast ohne Lamellipodien oder Fokalkontakte auf ZnO-Nanostäben ^[84]



(b) Sternzelle auf Si-Nanowires mit weit reichenden Filopodien ^[85]



(c) Embryonale Maus-Stammzelle, penetriert von Si-Nanowires ^[86]

Abbildung 3.23: REM-Aufnahmen verschiedener Zelltypen auf Nanostrukturen

Erhebungen bevorzugen statt dazwischen zu wachsen. Außerdem gelang die Zielfindung der Axone erst dann, wenn die lateralen Abmessungen des Musters größer als 100 nm waren ^[87]. Der Einfluss von Si-Nanopillars mit unterschiedlichen Durchmesser auf die Entwicklung von Neuronen wurde von Dowell-Mesfin et al. untersucht. Durch diese Nanostrukturen wurden deutliche Veränderungen in der Neuronenpolarität, der Axonlänge und in der Struktur der Wachstumskegel hervorgerufen ^[88]. Damit war aufgrund der Si-Nanopillars eine nachhaltige Beeinflussung der Organisationsprozesse von Axonen und Dendriten möglich. Eine andere Studie von Qi et al. zur Wechselwirkung zwischen Arrays aus Si-Nanowires und Tumor- und Sternzelllinien zeigte erstmals eine Verstärkung von Adhäsionskräften durch Nanostrukturen. Allerdings kam es gleichzeitig zu einer gerin-

geren Zellausbreitung, resultierend in kleineren Zelldurchmessern (s. Abb. 3.23(b)) und einer reduzierten Zell-Zell-Kommunikation [85].

Verschiedene Ansätze zur Mikro- und Nanostrukturierung von Oberflächen sind auch bereits in die Entwicklung neuer Elektroden eingeflossen (s. Kapitel 3.2.2). Arrays aus CNTs wurden von Wang et al. auf Elektroden aufgebracht und dann mit Neuronen besiedelt. Dadurch waren wiederholt erfolgreiche Stimulationen der Neuronen möglich [34]. CNTs mit einer mechanischen Verstärkung aus leitfähigen Polymeren an den Außenwänden wurden von Nguyen-Vu et al. eingesetzt um Elektroden zu modifizieren. Sie untersuchten die Kopplung von Nebennierentumorzellen (kurz: PC12) an diese Nanostrukturen. In Abhängigkeit von der Polymerbeschichtung wurden unterschiedliche Zellmorphologien beobachtet. Einige Zellen ordneten sich hängend zwischen benachbarten Bündeln aus CNTs an, während andere Zellen anscheinend sogar von CNTs penetriert wurden [35]. Mit Arrays aus Si-Nanowires wurde von Kim et al. ebenfalls ein Eindringen in Nierenepithelzellen (kurz: HEK, human embryonic kidney) und Stammzellen von Mäusen nachgewiesen [86], wie Abb. 3.23(c) zeigt. Für Nanowires mit Durchmessern bis zu 400 nm starben die Zellen zwar innerhalb eines Tages, allerdings überlebten sie auf Nanodrähten mit nur 30 nm Durchmesser bis zu einer Woche.

Die Kopplung von Zellen an biokompatible Nanosäulen aus Gold wurde bislang noch nicht untersucht. Gerade für bioelektronische Anwendungen ist die Vitalität elektroaktiver Zellen auf leitenden Gold-Nanopillars von großer Bedeutung. Die Vitalität und Adhäsion verschiedener elektroaktiver Zelltypen auf Gold-Nanopillars wird daher in Kapitel 5.3 untersucht.

3.5.3 Das Hodgkin-Huxley Modell zur Simulation von Neuronen

Ein erstes Modell zur Simulation von Neuronen wurde im Jahr 1952 von Hodgkin und Huxley vorgestellt. In diesem Modell wurden die spannungsabhängigen Membranwiderstände für die Ionenströme innerhalb einer Membran durch regelbare Widerstände dargestellt, wie Abb. 3.24 zeigt. Für die Widerstände gilt: $R_{Na} = \frac{1}{g_{Na}}$, $R_K = \frac{1}{g_K}$ und $R_l = \frac{1}{g_l}$, wobei g_{Na} , g_K und g_l die Leitfähigkeiten der jeweiligen Ionenkanäle sind. R_{Na} und R_K sind abhängig von Zeit und Membranpotenzial, während R_l konstant bleibt.

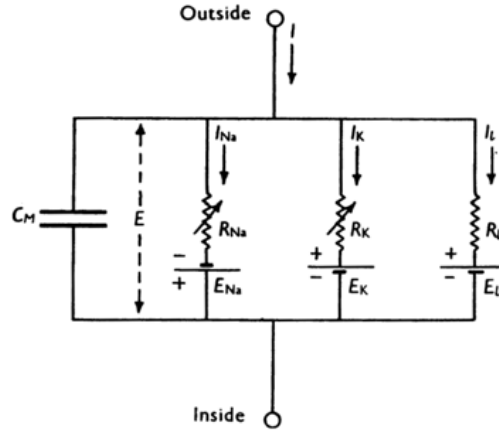


Abbildung 3.24: Elektrischer Schaltkreis zur Beschreibung einer neuronalen Zellmembran [89].

R_{Na} : variabler Widerstand des Na^+ -Ionenkanals, R_K : variabler Widerstand des K^+ -Ionenkanals, R_L : konstanter Leck-Widerstand

Der gesamte Membranstrom I wird nun in einen kapazitiven und einen ionischen Strom unterteilt, wobei c_M die spezifische Membrankapazität ist:

$$I = c_M \cdot \frac{dV}{dt} + I_i \quad (3.26)$$

mit $I_i = I_{Na} + I_K + I_L$. I_{Na} ist der Anteil aus Na^+ -Ionen, I_K ist auf K^+ -Ionen zurückzuführen, und I_L bezeichnet einen Leckstrom, der durch Chlorid- und andere Ionen hervorgerufen wird. Diese individuellen Ionenströme lassen sich auch wie folgt darstellen:

$$I_{Na} = g_{Na} \cdot (E - E_{Na}) \quad (3.27)$$

$$I_K = g_K \cdot (E - E_K) \quad (3.28)$$

$$I_L = g_L \cdot (E - E_L) \quad (3.29)$$

Dabei bezeichnen E_{Na} , E_K und E_L die Gleichgewichtspotenziale, an denen der jeweilige Ionenstrom gleich Null ist. Laut Hodgkin und Huxley können die Gleichgewichtspotenziale als konstant angenommen werden, ebenso g_L und C_M . Da g_{Na} und g_K von Zeit und Membranpotential abhängen, sind diese beiden Größen verantwortlich für die Entstehung eines Aktionspotenzials [89, 90].

3.5.4 Kopplungsmodell für Zellen auf Mikroelektroden

Ein einfaches Modell zur Beschreibung des Signalverhaltens neuronaler Zellen auf planaren MEAs wurde im Jahr 1989 von Regehr et al. vorgestellt ^[15]. Dieses Modell wird auch als Punkt-Kontaktmodell bezeichnet und geht von der Annahme aus, dass alle Ströme durch einen gemeinsamen Punkt fließen, wobei die Geometrie des Kontakts vernachlässigt wird. Regehr et al. stellten mit ihrem Modell die Signalform der Spannung dar, die bei simultaner Messung an mehreren Neuronen verzeichnet wurde. Beim Vergleich von Modell und realen Messungen an neuronalen Netzwerken erkannten sie, dass Potenziale, die direkt unter dem Zellkörper abgeleitet wurden, Ableitungen des intrazellulären Potenzials waren, während Signale, die an den Axonstümpfen gemessen wurden, proportional zu den einwärts gerichteten Na^+ -Strömen waren. Eine schematische Ansicht eines Neurons auf einer Elektrode ist in Abb. 3.25 zu sehen. Darin zu erkennen sind die Impedanzen der Zelle (Z_{Cell}) und der Elektrode (Z_e) sowie das Ersatzschaltbild der kontaktierten Zellmembran. Außerdem eingezeichnet sind der Abdichtwiderstand zwischen Elektrode und Zelle (R_{Seal}), der abhängig ist von Medium, Zelltyp und Abstand zwischen Zelle und Isolationschicht, sowie der Ausbreitungswiderstand (R_{Spread}), der von der extrazellulären Lösung abhängt. Beide Widerstände sind linear proportional zum spezifischen Widerstand ρ des Mediums.

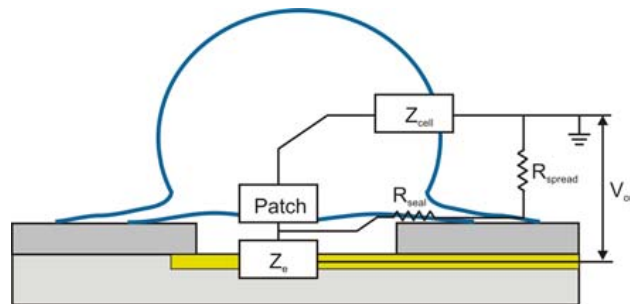


Abbildung 3.25: Schematische Darstellung eines Neurons auf einer Mikroelektrode, nach ^[15]

Regehr et al. stellten auch ein Ersatzschaltbild für ein Neuron auf einer Elektrode auf, das in Abb. 3.26 zu sehen ist. In die Patch-Region zwischen Zelle und Elektrode fließt für die verschiedenen Ionenkanäle das Hodgkin-Huxley-Modell ein. Auch hier werden die zeit- und spannungsabhängigen Ionenleitfähigkeiten mit regelbaren Widerständen visualisiert, die daher auch als Hodgkin-Huxley-Elemente bezeichnet werden. Außerdem sind die Widerstände und Impedanzen aus Abb. 3.25 zu erkennen.

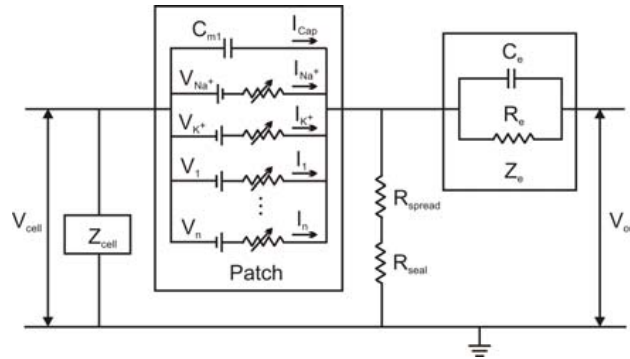


Abbildung 3.26: Ersatzschaltbild eines Neurons mit Elektrodenkontakt, nach [15]

Dieser qualitativen Beschreibung der Kopplung zwischen Neuronen und Mikroelektroden folgte eine Berechnung des extrazellulären Potentials, die 1991 von Lind et al. durchgeführt wurde. Um den Einfluss verschiedener Elektroden-Designs auf die Höhe der Signalamplituden zu ermitteln, wurden unter Verwendung von finiten Elementen die Ströme durch die Zellmembran modelliert [91].

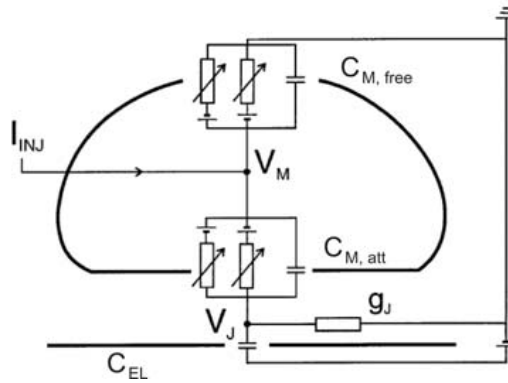


Abbildung 3.27: Ersatzschaltbild für die Kopplung zwischen Neuron und Siliziumchip [92]

Beide Modelle von Regehr und Lind wurden später noch erweitert, indem spannungsgesteuerte Ionenkanäle in der Kontaktregion zwischen Zelle und Elektrode in die Modellierung mit einbezogen wurden. Fromherz et al. modellierten die Neuron-Silizium-Kontaktstelle und gingen dafür - ebenfalls auf der Basis des Hodgkin-Huxley-Modells - von einem zweidimensionalen Kern-Mantel-Leiter aus. Die Zellmembran ist vom Silizium

durch eine Elektrolytschicht von ca. 10 bis 100 nm getrennt. Dabei wird das Zytoplasma durch die Zellmembran vom Elektrolyten isoliert. Gleichzeitig isoliert eine Schicht aus Siliziumdioxid den Silizium-Chip vom Elektrolyten ^[92, 93]. Die wesentlichen Verhaltensweisen können durch ein zweigeteiltes Ersatzschaltbild beschrieben werden, das für zwei spezifische Ionenleitfähigkeiten in Abb. 3.27 dargestellt ist. Die Zellmembran - hier unterteilt in die gekoppelte Fläche A_{JM} und den Bereich A_{FM} ohne Kontakt zwischen Silizium und Zelle - lässt sich über verschiedene ionenspezifische Leitfähigkeiten pro freier bzw. gekoppelter Fläche charakterisieren (g_{FM}^i bzw. g_{JM}^i). Diese Leitfähigkeiten hängen von der Membranspannung ab. Die spezifische Membrankapazität c_M ist gleich für die gesamte Zelle, und die Mikroelektrode hat die spezifische Kapazität c_{EL} . Die elektrische Abdichtung zwischen Zelle und Chip lässt sich durch die spezifische Leitfähigkeit g_J beschreiben. Durch eine Mikropipette wird ein Strom I_{INJ} in die Zelle injiziert. Dann werden die intrazelluläre Spannung V_M und die lokale extrazelluläre Spannung V_J über die Strombilanz in der Zelle und an der Schnittstelle zum Chip bestimmt. Unter der Annahme einer schnellen, schwachen und gleichzeitig kleinen Kopplung zwischen Zelle und Chip lässt sich $V_J(t)$ dann über die Differenzen der ionischen Ströme und durch I_{INJ} bestimmen zu ^[92]:

$$c_{EL} \frac{dV_J}{dt} + g_J V_J = \sum_i (g_{JM}^i - g_{FM}^i) \cdot (V_M - V_0^i) + \frac{I_{INJ}}{A_{FM}} \quad (3.30)$$

Mit diesem Kopplungsmodell unter den drei genannten Bedingungen konnten Fromherz et al. zeigen, dass extrazelluläre Signale ableitungen deutlich von den spannungsgesteuerten Ionenleitfähigkeiten einer Zellmembran abhängen.

Auf der Basis eines einfachen Impedanzmodells für das Interface zwischen Neuron und Elektrode gelang es Buitengeweg et al. im Jahr 2002 den linearen Anteil des neuronalen Antwortsignals bei Stimulation durch einen Strompuls vorherzusagen ^[94, 95]. Hieraus ließ sich der nichtlineare Anteil der extrazellulären Antwort abschätzen, woraus anschließend die aktiven Membranströme für die unterschiedlichen Ionenkanäle ermittelt werden konnten. Durch die Spannungsabhängigkeit der Membranströme wurde dann auf die Verteilung der unterschiedlichen Kanäle an der Zellmembran geschlossen. Hierfür stellten Buitengeweg et al. ein Modell mit finiten Elementen auf, das den Einfluss der Ionenkanal-Verteilung auf den Kontakt zwischen Neuron und Elektrode beschreibt. Ihre Simulationen verglichen sie mit experimentellen Daten und kamen zu dem Schluss, dass die Verteilung der Ionenkanäle ausschlaggebend für die Ableitung und Interpretation extrazellulärer Signale ist.

4 Methoden und Materialien

4.1 Herstellung von Gold-Nanopillar-Arrays

Für die Fabrikation von biokompatiblen Gold-Nanopillar-Arrays wurde ein Template-gestütztes Verfahren genutzt, in dem zunächst nanoporöses Aluminiumoxid hergestellt wurde. Die Geometrie der entstandenen Pillars richtete sich dabei nach Porendurchmesser, -verteilung und -abstand des Aluminiumoxid-Templates. Anschließend wurden die Poren durch Elektrodeposition mit Gold gefüllt und für die Zellkopplung vorbereitet.

4.1.1 Anodisierung von Aluminiumsubstraten

Zur Herstellung von nanoporösen Aluminiumoxid-Templates wurden Aluminiumschichten mit Dicken zwischen 400 nm und 800 nm verwendet, die am Forschungszentrum caesar (Bonn) prozessiert wurden. Als Substrat wurden 100 mm große Si Wafer (Si-Mat, Landsberg) eingesetzt, die mit Phosphor dotiert waren. Die Wafer waren $525 \pm 25 \mu\text{m}$ dick, in $\langle 100 \rangle$ Richtung orientiert und hatten einen Widerstand von 1 bis $10 \Omega\text{cm}$.

Zuvor wurden sie mittels Nassoxidation thermisch oxidiert, um eine 1500 nm dicke SiO_2 -Schicht entstehen zu lassen. In einer Sputteranlage vom Typ ZH 620 der Firma Emerald Technology Ventures AG (Zürich) wurden dann 10 nm Ti als Adhäsionsschicht und 200 nm Au als leitfähige Schicht auf die Wafer aufgebracht. Anschließend wurde hierauf mit einem Elektronenstrahlverdampfer vom Modell BAK640 der Firma Unaxis GmbH (Hanau) eine Aluminiumschicht mit der gewünschten Dicke deponiert. Zur Vorbereitung auf die Anodisierung wurden die Wafer mit einer Wafersäge in Stücke der Größe $11 \text{ mm} \times 11 \text{ mm}$ geschnitten. Es folgte eine mehrstündige Reinigung in Aceton zur Entfernung organischer Kontaminationen. Abschließend wurden die Substrate in Isopropanol gespült und mit Stickstoff getrocknet.

Die Anodisierung wurde in einer eigens designten Anodisierungszelle aus PMMA durchgeführt, welche in Abb. 4.1 zu sehen ist. Im Säurereservoir befand sich ein Platinblech als Gegenelektrode, das $0,36\text{ cm}^2$ groß war. Der untere Teil des Säurereservoirs verjüngte sich zu einem Zylinder, und an dieser Stelle wurde das Al-Substrat eingebaut. Zwischen Substrat und Zylinder wurde ein O-Ring aus Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM) als Dichtung eingesetzt, und so konnte die Probe von außen über eine Krokodilklemme kontaktiert werden. Der O-Ring hatte eine Innenfläche von $0,35\text{ cm}^2$. Somit war die Pt-Elektrode größer als die zu anodisierende Al-Fläche, was eine notwendige Bedingung für die erfolgreiche Anodisierung war. Der Abstand zwischen Probe und Pt-Kathode wurde auf $2,5\text{ cm}$ eingestellt.

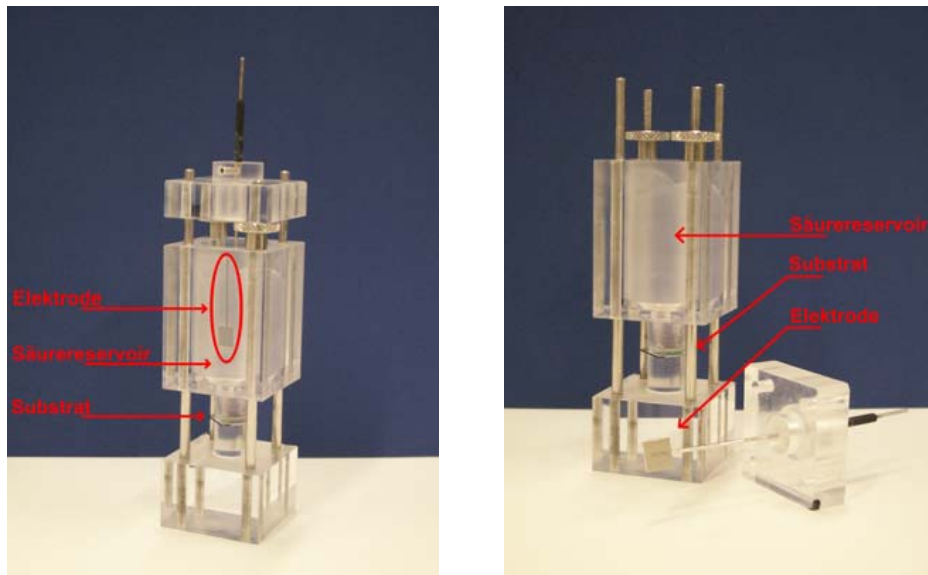


Abbildung 4.1: Anodisierungszelle aus PMMA mit Pt-Elektrode ^[96]

Für die Anodisierung wurde - wenn nicht anders erwähnt - $0,3\text{ M}$ Oxalsäure (Merck KGaA, Darmstadt) verwendet. Über ein Netzgerät vom Typ Lambda-ZUP-1.8 (Schulz-Electronic GmbH, Baden-Baden) wurde eine Anodisierungsspannung angelegt, die für $0,3\text{ M}$ Oxalsäure 40 V betrug. Während der Anodisierung wurde der Stromverlauf aufgezeichnet, um das Stadium des Porenwachstums zu kontrollieren. Hierfür kam ein LabView-Programm zum Einsatz, das auch das Netzgerät steuerte (s. Abb. 4.2). Der Anodisierungsprozess wurde angehalten, wenn der Strom das zweite Plateau erreichte, da die Poren an diesem Punkt bis zum darunterliegenden Gold reichten.

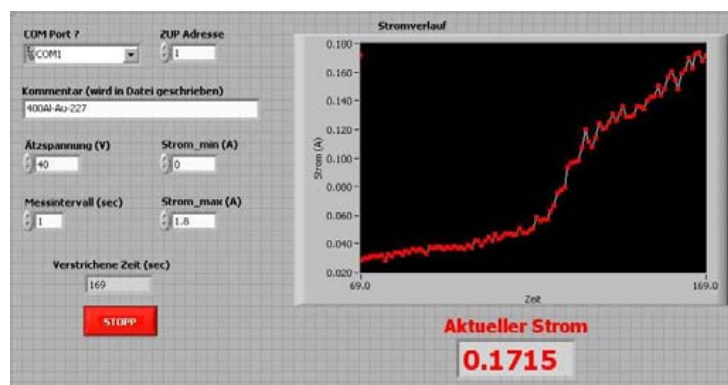


Abbildung 4.2: Bildschirmsicht des LabView-Programms zur Steuerung des Anodierungsprozesses: typischer Stromverlauf während des Porenwachstums

Abschließend wurden die Poren erweitert und die Barrier Layer am Boden der Poren entfernt, so dass ein direkter Kontakt zum darunterliegenden Gold entstand. Dieser Schritt geschah durch Ätzen in 5 wt% Phosphorsäure (H_3PO_4 , KMF-Laborchemie Handels GmbH, Lohmar), meist für 40 min. Je nach gewünschtem Porendurchmesser konnte diese Zeit aber auch zwischen 20 und 60 min variieren. Anschließend wurden die Substrate mit destilliertem Wasser gereinigt und mit Stickstoff getrocknet.

4.1.2 Galvanisierung

Als Galvanisierungsbad für die Füllung der nanoporösen Al_2O_3 -Templates mit Gold wurde eine Kaliumgoldcyanidlösung des Typs PUR-A-Gold 401 (Enthone GmbH, Langenfeld) verwendet. Die elektrochemische Deposition fand mit einem Setup vom Typ Galvano Philico der Firma Heraeus (Hanau) statt. In diesem Bad befanden sich ein Platingitter, das als Kathode fungierte, und vier Aluminiumoxid-Templates, die mit einer Gesamtfläche von ca. 4 cm^2 gleichzeitig als Anode dienten. Den schematischen Aufbau zeigt Abb. 4.3.

Die Vorbereitung des Goldbades erfolgte in den folgenden Schritten:

- 1,5 l PUR-A-Gold 401 wurden auf 60°C erhitzt und anschließend mit einem Filter des Typs 589³ blue ribbon (Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) gefiltert.

- 40,2 g Goldcyanid ($\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$) wurden in 1 l destilliertem Wasser gelöst, das ebenfalls auf 60°C erhitzt wurde.
- Beide Lösungen wurden gemischt, bis das Gesamtvolumen erreicht war.

Das Goldbad hatte bei einer Temperatur von 60°C einen pH-Wert von 5,8, eine Dichte von $1,11 \frac{\text{g}}{\text{ml}}$ und eine Goldkonzentration von $10 \frac{\text{g}}{\text{l}}$. Dem Galvanisierungsprozess lag die folgende Reaktionsgleichung zugrunde:

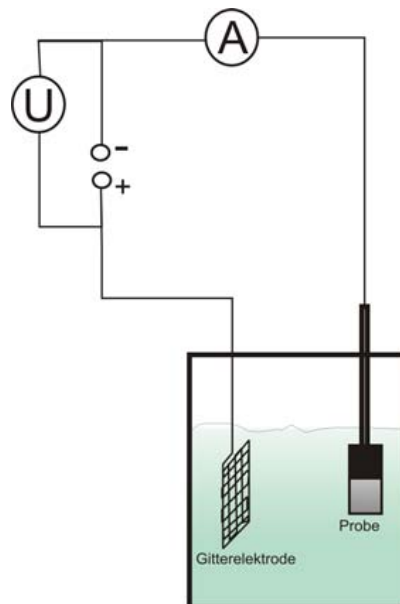


Abbildung 4.3: Versuchsaufbau zur Galvanisierung in Kaliumgoldcyanid

Als Netzgerät wurde ebenfalls ein Lambda-ZUP-1.8 verwendet. Bei einer Temperatur von 60°C wurde an die Proben im Goldbad ein konstanter Strom von 25 mA angelegt, der über ein Messgerät kontrolliert wurde. Bei diesen Einstellungen betrug die Depositionrate des Goldes für die Gesamtfläche von 4 cm^2 ca. $0,25 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$. Die Dauer der Galvanisierung richtete sich nach der Dicke der eingebauten Aluminiumschichten und der gewünschten Pillarhöhe. Für eine Pillarlänge von ca. 200 nm wurde z.B. 60 s – 70 s lang galvanisiert, für Pillars mit 400 nm Höhe wurden 120 s gewählt. Nach der Deposition des Goldes in die Nanoporen

wurden diese in 20 wt% Kaliumhydroxid (KMF-Laborchemie Handels GmbH, Lohmar) entfernt. Die Substrate befanden sich für 1 h – 2 h im KOH und wurden anschließend mehrere Stunden mit destilliertem Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet. Abb. 4.4 zeigt schematisch den Gesamtablauf der Pillarherstellung.

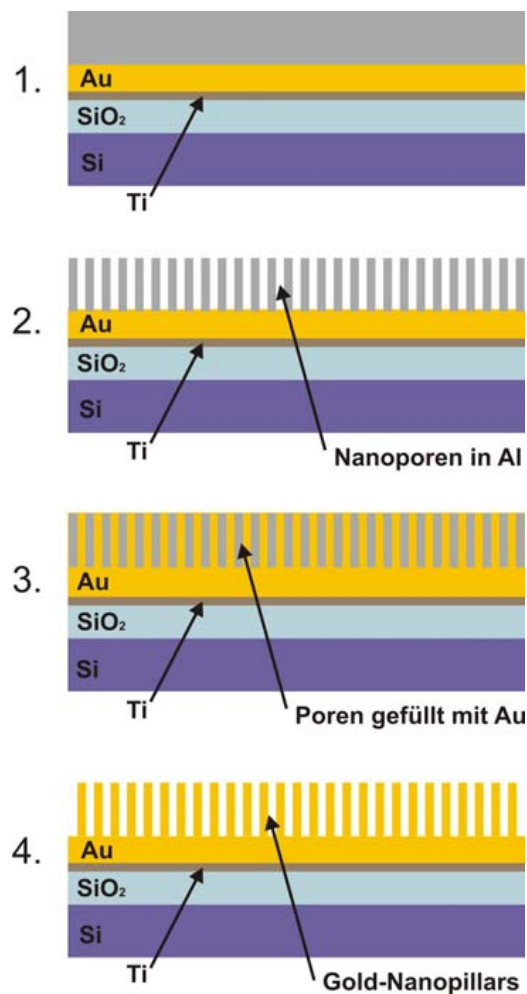


Abbildung 4.4: Pillarherstellung in vier Stufen:

- 1) Deposition von Metallschichten im Reinraum
- 2) Anodisierung in Oxalsäure
- 3) Galvanisierung in Kaliumgoldcyanid
- 4) Entfernung des Al₂O₃ in KOH

4.2 Charakterisierung der Nanostrukturen

Die Geometrie und Struktur der nanoporösen Aluminiumoxid-Membranen und der Arrays aus Gold-Nanopillars wurden zu verschiedenen Zeiten des Herstellungsprozesses mit dem Rasterelektronenmikroskop analysiert. Daran schloss sich die elektrochemische Untersuchung mittels Zyklovoltametrie und Impedanzspektroskopie an.

4.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die wichtigste Methode zur Bestimmung der Pillargeometrie stellte das Rasterelektronenmikroskop (REM) dar. In der vorliegenden Arbeit wurde ein REM vom Typ Zeiss Gemini 1550 (Carl Zeiss SMT AG, Jena) verwendet.

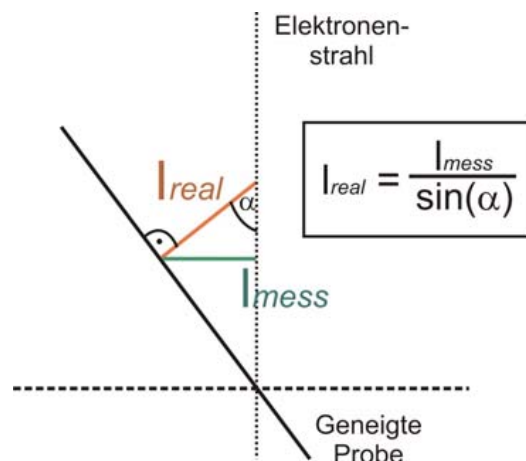


Abbildung 4.5: Berechnung der realen Höhe von Objekten, die im REM um den Winkel α geneigt sind. Die Höhe wurde um den Faktor $\sin(\alpha)^{-1}$ korrigiert.

Sowohl die Nanoporen aus Aluminiumoxid als auch die Gold-Nanopillars wurden in der Aufsicht mit Vergrößerungen von 20 kx und 100 kx analysiert. Die Nanopillars wurden zusätzlich unter einem Winkel von 60° mit Vergrößerungen von 50 kx und 100 kx gescannt, um ihre Höhe bestimmen zu können. Wurden die Proben mit einem von 0° abweichenden Winkel analysiert, so mussten Höhen, die unmittelbar aus den REM-Aufnahmen ermittelt wurden, aufgrund der räumlichen Verzerrung um den Faktor $\sin(\alpha)^{-1}$ korrigiert werden, wie Abb. 4.5 zeigt.

4.2.2 Statistische Analyse der Nanostrukturen

Die statistische Auswertung der REM-Aufnahmen erfolgte mit einem Matlab-Programm. Dieses lieferte den Porendurchmesser, ihren Abstand, die Porosität und die Anzahl der nächsten Nachbarn im Template. Im weiteren Verlauf wurde diese Auswertungsmethode auch für die Nanopillar-Arrays eingesetzt.

Das Programm fand durch Filterfunktionen und Hintergrundkorrekturen die Grenzen der Nanostrukturen (siehe Abb. 4.6) und ermittelte hieraus deren Verteilung und die genannten Parameter. Von jeder Probe wurden jeweils drei Bilder der Vergrößerung 100 kx analysiert, die an verschiedenen Stellen aufgenommen wurden.

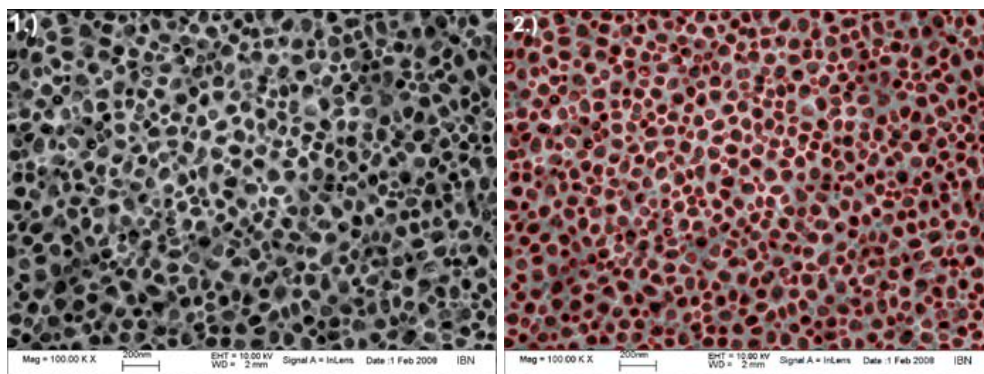


Abbildung 4.6: Erkennung der Nanoporen mit Hilfe des Matlab-Programms [96]

- 1.) Ursprüngliche REM-Aufnahme
- 2.) Rot markierte Nanoporen

Die resultierenden Werte für die jeweiligen Parameter wurden als Histogramme ausgegeben, die exemplarisch in Abb. 4.7 zu sehen sind. Da die Poren in einem selbstorganisierten Prozess entstehen und eine weitreichende Ordnung aufweisen, konnte für die Auswertung der Histogramme eine Normalverteilung angenommen werden. Für die Bestimmung der Porosität wurde die Fläche jeder einzelnen Pore durch die gesamte Fläche der analysierten REM-Aufnahme dividiert. Da in einem idealen Porenarrangement eine hexagonale Struktur entsteht, in der jede Pore sechs nächste Nachbarn hat (s. Kapitel 3.3), wurde für die Auswertung des Porenabstandes dieser Wert angenommen.

Darüber hinaus flossen Artefakte in den Nanoporen, deren Größe einen frei wählbaren Schwellenwert unterschreitet, nicht mit in die Auswertung ein, so dass die Verteilungen nicht zu kleineren Werten hin verfälscht wurden.

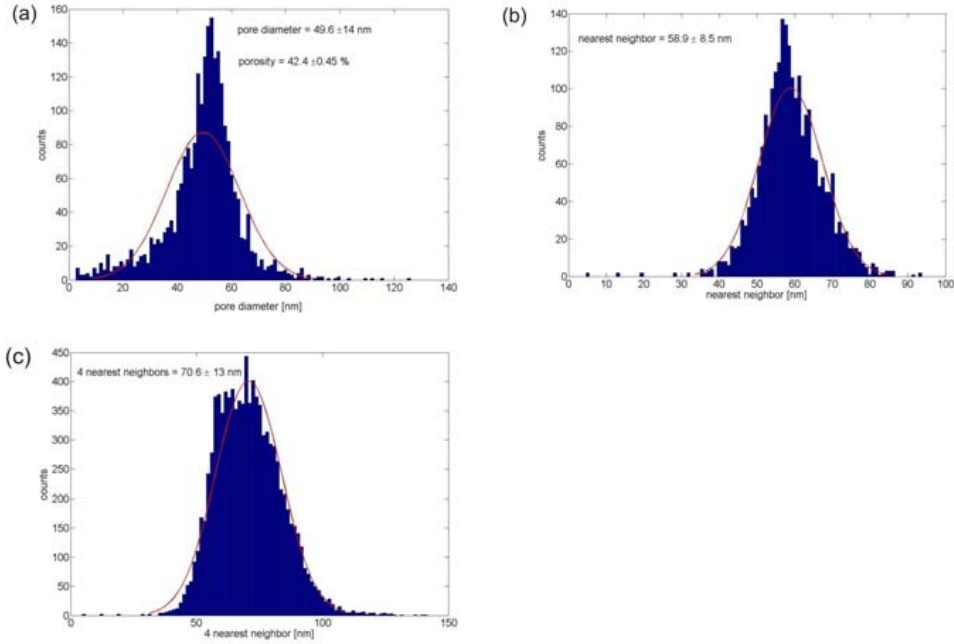


Abbildung 4.7: Ermittlung verschiedener Porenparameter mittels Histogrammen ^[96]

- (a) Porendurchmesser
- (b) Nächste Nachbarn
- (c) 4 nächste Nachbarn

Für die Ermittlung der geometrischen Oberfläche der Nanopillars war außerdem die Bestimmung ihrer durchschnittlichen Höhe erforderlich. Hierfür wurden die Proben zunächst gebrochen und unter einem Winkel von 60° unter dem REM analysiert. Pro Probe wurden 3 Messungen gemacht, und hieraus wurde die durchschnittliche Pillarhöhe bestimmt.

Über die Formel

$$A_{3D} = A_0 + \frac{\pi d_p h A_0}{\sin(60^\circ) d_{int}^2} \quad (4.1)$$

wurde daraus die Pillaroberfläche bestimmt mit der Pillarhöhe h , der Grundfläche A_0 , dem Pillardurchmesser d_p und dem Pillarabstand d_{int} . d_p und d_{int} sind zuvor aus der statistischen Auswertung mit Matlab hervorgegangen. Für die Bestimmung von A_0 wurden die Substrate vorher mit einem handelsüblichen Scanner mit einer Auflösung von 300 dpi

(s. Abb. 4.8) eingescannt. Die so gewonnenen Bilder wurden anschließend mit der Software Scion Image (Scion Corporation, Maryland, USA) über einen Kontrastabgleich ausgewertet. So konnten genau die Bereiche der Proben ermittelt werden, in denen tatsächlich Nanopillars gewachsen waren. Dieser Wert floss dann als jeweiliges A_0 in die Berechnung der tatsächlichen geometrischen Oberfläche ein.

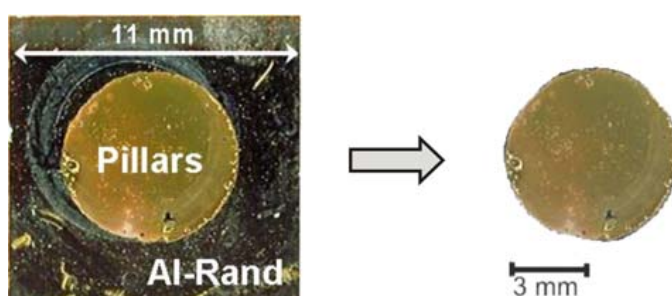


Abbildung 4.8: Grundfläche der Nanopillar-Proben: Nach dem Einscannen der Substrate wurde der planare Al-Rand im linken Bild über einen Kontrastabgleich in Scion Image entfernt.

4.2.3 Elektrochemische Eigenschaften

Die elektrochemischen Eigenschaften von Gold-Nanopillars wurden mittels Zyklovoltametrie und Impedanzspektroskopie in verschiedenen Elektrolyten untersucht. Als Referenz dienten hierbei planare Goldoberflächen. Aus den unterschiedlichen Methoden wurde für alle Proben jeweils die elektrochemisch aktive Oberfläche bestimmt und mit der geometrischen Oberfläche verglichen, die zuvor im Rasterelektronenmikroskop ermittelt wurde. Abschließend erfolgte anhand der elektroaktiven Oberfläche ein Vergleich zwischen den verschiedenen Messmethoden. Als Elektrolyte kamen zum Einsatz: 0,15 M NaCl (Sigma) und 1 mM Hexacyanoferrat(II) ($K_4[Fe(CN)_6]$, Fluka) in 1 M KCl (Sigma).

Für alle Messungen wurde ein 3-Elektroden-Setup verwendet, das schematisch in Abb. 4.9 dargestellt ist. Dieser Aufbau bestand aus einem Platindraht als Zählelektrode, einer Ag/AgCl-Referenzelektrode in 3 M KCl und den Nanostrukturen als Arbeitselektrode. Zur Messung wurde die Arbeitselektrode mit der Messelektrode des Potentiostaten zusammengeschaltet, und alle Potenziale wurden auf die Referenzelektrode bezogen.

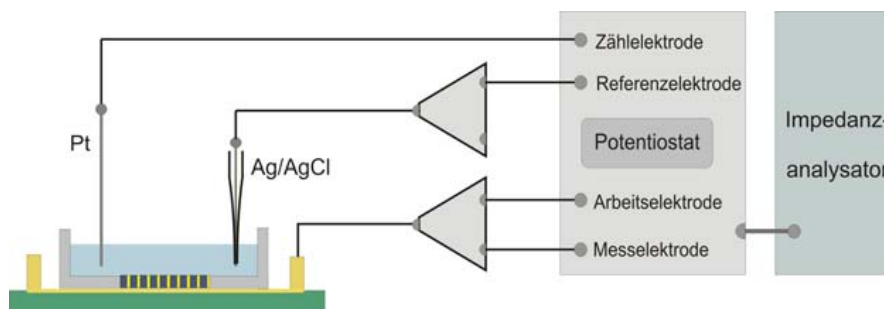


Abbildung 4.9: Messaufbau für Zyklovoltammetrie und Impedanzspektroskopie an Gold-Nanostrukturen

Die Probe befand sich in einer eigens für diesen Zweck gebauten Messzelle aus Teflon, die in Abb. 4.10 zu sehen ist. Sie wurde durch einen O-Ring aus EPDM abgedichtet, der - wie bei der Anodisierungszelle - eine Innenfläche von $0,35 \text{ cm}^2$ hat. Das elektrische Signal der Probe wurde außerhalb über zwei Federstifte aus Messing abgeleitet. Diese Stifte waren mit einem Kupferring verbunden, an dem ein Kabel zur Signalweiterleitung befestigt war. Die Teflonzelle wurde dann mit dem jeweiligen Elektrolyten befüllt und verschlossen. Um Oxidationseffekte in den Ergebnissen zu vermeiden, wurde der Elektrolyt in den meisten Experimenten vor der Messung 30 bis 40 min mit Argon gespült.

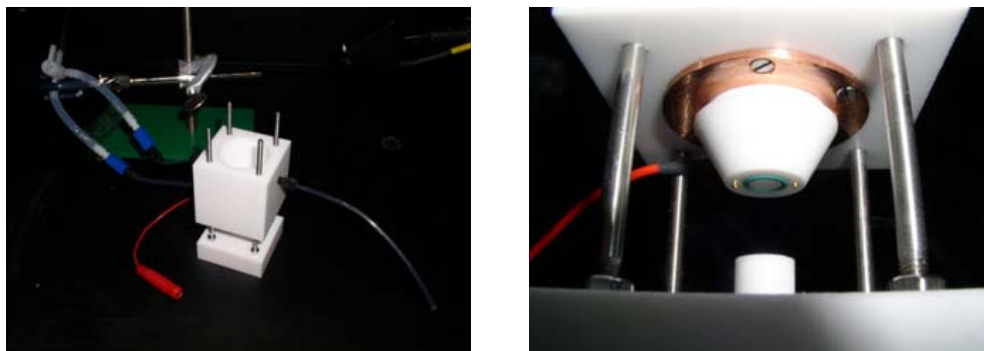


Abbildung 4.10: Teflonzelle für elektrochemische Messungen^[97]. Im rechten Bild sind die Federstifte und der Kupferring zur Signalmessung zu sehen.

Alle Versuche an großflächigen Nanopillar-Arrays wurden mit einem EG&G 283 Potentiostaten (Princeton Applied Research, Princeton, NJ, USA) durchgeführt. Bei den voltametrischen Experimenten wurden abhängig vom Versuchsziel Scangeschwindigkeiten zwischen $5 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$ und $10000 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$ gewählt. Für die Impedanzspektroskopie kam zusätzlich ein

Solartron 1260 Impedanzanalysator (Solartron Analytical, UK) zum Einsatz, mit dem die Impedanz im Frequenzbereich zwischen 1 Hz und 10^4 Hz untersucht wurde. Hierbei lag eine AC Spannung von 10 mV an.

Für die Untersuchung von nanostrukturierten und planaren MEAs mittels Impedanzspektroskopie wurde ein Autolab Potentiostat PGSTAT 302 verwendet (Eco Chemie BV, Utrecht, Niederlande). Die Impedanz der MEAs wurde in einem Zweielektroden-Setup von 1 Hz bis 10^4 Hz gemessen. Hierfür wurden die Zähl- und die Referenzelektrode in Abb. 4.9 zusammengeschaltet. Als Referenzelektrode kam eine Ag/AgCl-Elektrode in 3 M KCl-Lösung vom Modell MF-2078, RE-6 (BASi, Warwickshire, UK) zum Einsatz. Die MEAs befanden sich während der Messung in einer offenen Messbox, in der die 64 Kanäle auf dem Chip einzeln kontaktiert werden konnten (s. Abb. 4.17(b) in Kapitel 4.5).

Zur Auswertung der Impedanzspektren, die mit beiden Potentiostaten aufgenommen wurden, wurde die Software ZView Version 2.9b verwendet, mit der die Daten gemäß verschiedenen Ersatzschaltbildern gefittet werden konnten. Die Auswertung der Voltamogramme erfolgte mit CorrWare 3.1. Beide Programme sind frei verfügbare Software von Scribner Associates Inc. (Southern Pines).

Die Impedanzmessungen an einzelnen MEA-Elektroden wurden anschließend durch die Aufnahme von Transfercharakteristika mit Hilfe eines Lock-In-Verstärkers vom Modell SR 830 DSP von Stanford Research Systems (Sunnyvale, Kalifornien) ergänzt. Hierfür befanden sich die MEAs wiederum in der oben beschriebenen Messbox, so dass die Elektroden einzeln angesteuert werden konnten. Im Bereich von 1 Hz bis 10^4 Hz wurde nun gemessen, wie viel Prozent eines angelegten Spannungssignals von den verschiedenen MEAs hindurch gelassen wurde. Für die Verstärkung dieser Elektrodensignale wurde ein MEA-Verstärker-System verwendet, das in der elektronischen Werkstatt des IBN-2 angefertigt worden war ^[23].

Aus den Transfercharakteristika wurde für die Frequenz 100 Hz das Verhältnis y von angelegter Spannung U_0 und Spannungsantwort U_i abgelesen. Für y gilt mit der Impedanz Z_{leak} der Passivierungsschicht und der Impedanz Z_{el} der Mikroelektrode:

$$y = \frac{U_i}{U_0} = \frac{Z_{leak}}{Z_{leak} + Z_{el}} \quad (4.2)$$

Um aus den Transfermessungen zusammen mit den Resultaten der Impedanzspektroskopie Ergebnisse über die Qualität der Passivierung, d.h. über Z_{leak} , sowie die Impedanz der Elektroden Z_{el} zu erhalten, wurde das Modell eines Spannungsteilers für die Zellkopplung

an eine Mikroelektrode zugrunde gelegt (s. Abb. 4.11). Die Impedanzen der Leiterbahnen und des Elektrolyten wurden hierbei vernachlässigt.

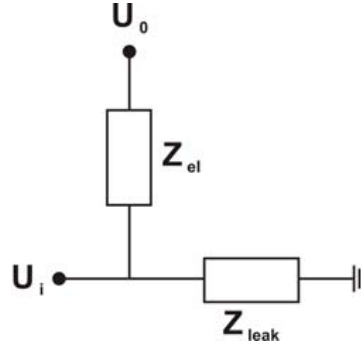


Abbildung 4.11: Modell eines Spannungsteilers zur Zellkopplung an eine Mikroelektrode. Z_{leak} : Impedanz der Passivierung, Z_{el} : Elektrodenimpedanz

Für die Impedanzmessungen sind beide Impedanzen in Abb. 4.11 geerdet, und U_0 liegt zwischen den Impedanzen an. Daraus ergibt sich folgende Relation:

$$\frac{1}{Z_{ges}} = \frac{1}{Z_{leak}} + \frac{1}{Z_{el}}, \quad (4.3)$$

und Z_{ges} ist aus den Impedanzspektren bekannt. Über die Gleichungen 4.2 und 4.3 lassen sich mit Kenntnis von y und Z_{ges} die folgenden Relationen für Z_{leak} und Z_{el} ermitteln:

$$Z_{el} = \frac{Z_{ges}}{y} \quad (4.4)$$

$$Z_{leak} = \frac{Z_{ges}}{1 - y} \quad (4.5)$$

4.3 Zellkopplung an Gold-Nanopillars

Die Eignung von Gold-Nanostrukturen als biokompatible Elektrodenoberfläche wurde sowohl für Primärzellen als auch für Zelllinien untersucht. Das Augenmerk lag hierbei auf der optimalen Überlebensrate der Zellen in Kontakt mit den Nanopillars. Für alle verwendeten Zelltypen lagen vor Versuchsbeginn reproduzierbare Ergebnisse des Zellwachstums auf planaren Goldoberflächen vor, die neben Glassubstraten bei allen Zellkulturen als Referenzen verwendet wurden.

4.3.1 Oberflächenmodifikationen für verschiedene Zelltypen

In Abhängigkeit des Zelltyps, der auf den Gold-Nanopillars kultiviert werden sollte, wurden verschiedene Oberflächenmodifikationen getestet.

Kortikale Rattenneuronen:

Für die Kultivierung kortikaler Rattenneuronen (RCN) wurden Embryonalzellen an Tag 18 der embryonalen Entwicklung isoliert. Anschließend wurden als Beschichtung für die Gold-Nanopillars zunächst das standardisierte Protein poly-L-Lysin (pLL) und ein Gel aus Extrazellulärmatrix-Proteinen (ECM-Gel) getestet. Für weiterführende Versuche wurden außerdem zwei unterschiedliche Typen von Self-Assembled Monolayers (SAMs), bestehend aus Alkylthiolketten, verwendet. Als Referenzen kamen in allen Versuchen planare Goldoberflächen zum Einsatz.

1. pLL: Vor der Beschichtung mit FITC-Poly-L-Lysin (Sigma) erfolgten zwei Reinigungsschritte für jeweils 5 Min im Ultraschallbad - in 70 % Ethanol und anschließend in sterilem bidestilliertem Wasser. Es folgte die Überführung der Proben unter die Sterilbank. Dort wurden sie über Nacht in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Solution (DPBS) mit Calcium (Ca) und Magnesium (Mg) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) inkubiert und so auf die Zellkultur am nächsten Tag vorbereitet.

Nach dem Absaugen der DPBS wurden die Gold-Nanostrukturen und planaren Goldsubstrate am nächsten Tag zwei Mal mit steriler Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen) gewaschen. Für die Beschichtung wurden 30 μ l pLL in 1470 μ l HBSS gelöst. Nachdem die Proben in dieser Lösung 1 h lang inkubiert wurden, folgten erneut zwei Waschschrte in HBSS, bevor die Zellen ausplattiert wurden.

2. ECM-Gel: Bei dieser Beschichtungsmethode wurde ECM-Gel (Sigma) im Verhältnis 1:1000 mit HBSS Puffer verdünnt. Anschließend wurde in dieser Lösung pLL mit einer Konzentration von 10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ gelöst, und diese Proteinlösung wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde auf die Substrate aufgebracht. Hiernach wurden die Substrate zwei Mal mit HBSS gewaschen.
3. Im Anschluss an die Proteinbeschichtungen wurden zwei verschiedene Beschichtungen mit SAMs getestet:

- die amino-terminierte SAM $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{NH}_2$ (ProChimia, Sopot, Polen), im folgenden NH_2 genannt sowie
- eine Mischung aus den folgenden SAMs mit Ethylenglykolgruppen:
 $(\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{EG}_3$ und $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{EG}_6\text{NH}_2(\text{HCl})$ (beide von ProChimia, Sopot, Polen), im folgenden kurz als MML (Mixed Monolayer) bezeichnet.

Vor der Beschichtung mit SAMs wurden die Oberflächen der Proben 10 Min lang im Sauerstoffplasma in einem Plasmaofen der Firma Diener (Nagold) bei 40 W und einem Druck von ca. 0,6 mbar aktiviert. Dann wurden die jeweiligen Monolayer in 100 % Ethanol mit einer Konzentration von $4 \times 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ gelöst. In dieser Lösung wurden die gereinigten Proben für vier Stunden inkubiert. Anschließend wurden sie zunächst mit 100 % Ethanol abgespült und danach durch zweimaliges Spülen für 5 Min im Ultraschallbad in 70 % Ethanol sterilisiert und unter die Sterilbank überführt. Zur Ausrichtung der Polyethylenglykolketten wurden die Proben nun noch zwei Mal für je 5 Min in sterilem bidestilliertem Wasser im Ultraschallbad behandelt. Bis zur Präparation der Zellen wurden die Proben mit den ausgerichteten SAMs dann in HBSS unter der Sterilbank gelagert.

Zur Verbesserung der Kulturbedingungen wurden die Zellkulturschalen (Durchmesser: 35 mm) mit einer Hintergrundbeschichtung aus pLL versehen, die mit einer Konzentration von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ in HBSS gelöst war. Neuronen, die auf dieser Hintergrundbeschichtung wuchsen, unterstützten das Wachstum der Neuronen auf der Probe dadurch, dass sie Cytokine abgaben.

Grillenneuronen:

Grillenneuronen wurden auf Substraten mit einer Proteinbeschichtung aus Concanavalin A (Con A) und auf unbeschichteten Proben ausgesät. Für beide Varianten wurden die Proben zuvor im Ultraschallbad je 5 Min lang in 70 % Ethanol und in bidestilliertem Wasser sterilisiert und anschließend für 2 Min im Sauerstoffplasma hydrophilisiert. Es folgte eine einstündige Inkubation der Substrate in einer conA-Lösung mit einer Konzentration von $0,2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ in ultrareinem Wasser. Abschließend wurden die Substrate mit bidestilliertem Wasser abgespült und waren für die Zellbesiedlung vorbereitet.

HL1-Zellen:

HL1-Zellen sind eine Zelllinie aus Herzmuskelzellen, die aus Kardiomyozyten von Mäusen gewonnen werden. Für die Kultivierung von HL1-Zellen wurden die Substrate zuvor

mit Fibronectin (Sigma) beschichtet. Hierfür wurde 1 ml Fibronectin in 200 ml 0,02 % Gelatine verdünnt und in dieser Konzentration auf die Substratoberfläche aufgebracht. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung wieder abgesaugt, und die Zellen konnten direkt ausgesät werden. Die HL1-Zelllinie stammte vom Louisiana State University Health Science Center (New Orleans, LA, USA).

HEK-Zellen:

HEK 293 - Zellen sind eine häufig verwendete Zelllinie, die aus humanen Nierenepithelzellen gewonnen wird. Die HEK-Zellen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, verfügen über Natriumkanäle vom Typ NaV 1.4. Die pLL-Beschichtung für die Kultivierung von HEK-Zellen folgte dem gleichen Protokoll wie für RCN (s. oben). Vergleichsweise wurden auf einem Teil der Substrate HEK-Zellen ohne vorherige Beschichtung ausgesät. In diesem Fall wurden die Proben vorher lediglich sterilisiert.

Weitere Details zur Kultivierung von HL1- und HEK-Zellen und von kortikalen Rattenneuronen sowie zu den dabei verwendeten Nährmedien und Lösungen können nachgelesen werden bei [98].

4.3.2 Live-Dead-Staining mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur statistischen Auswertung des Verhältnisses zwischen lebenden und toten Zellen wurde die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Hierfür kam ein Axio Imager Z.1 Apotome (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen) zum Einsatz. Alle Messungen wurden mit einem 20x-Immersionsobjektiv durchgeführt.

Als Farbstoff für lebende Zellen wurde Calcein (Sigma) verwendet, tote Zellen auf den Substraten wurden mit Ethidiumhomodimer-1 (EthD-1, Invitrogen) gefärbt. Die Färbelösung bestand aus PBS mit 1 mM Calcein und 2 mM EthD-1. Vor dem Färben wurden die Zellen zwei Mal mit vorgewärmter PBS-Lösung (1x) gewaschen und dann in der Färbelösung inkubiert. Die Fluoreszenzbilder wurden in der Regel im Zeitraum zwischen 5 und 15 Min mit dem 38HEGFP-Kanal ($\lambda = 488 \text{ nm}$) und dem 43HEDsRed-Kanal ($\lambda = 546 \text{ nm}$) des Apotomes aufgenommen. Anschließend wurden die Bilder statistisch mit der frei verfügbaren Software ImageJ ausgewertet.

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Aktinfilamente wurden die Neuronen 15 min lang mit 3,7 % Formaldehyd in PBS bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde die Fi-

xierung durch eine einstündige Inkubation in 5 %igem fötalem Kälberserum (kurz: FBS, Invitrogen) gestoppt. Die Zellmembran der Neuronen wurde dann 15 min lang in PBS mit 5 % FBS und 0,1 % Triton X-100 (Sigma) bei Raumtemperatur durchlässig gemacht. Als Fluoreszenzfarbstoff kam TRITC-Phalloidin (Sigma) zum Einsatz, das mit $20 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ in der Permeabilisierungslösung gelöst wurde. Hierin wurden die Proben für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit PBS und Wasser abgespült.

4.3.3 Fixierung und Kritisch-Punkt-Trocknung

Im Anschluss an die Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die Proben, auf denen erfolgreich Zellen kultiviert werden konnten, für REM-Aufnahmen fixiert. Zunächst wurde Glutaraldehyd (25 % EM Grade, Agar Scientific Ltd., Essex) in 20 mM des Puffers 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (kurz: HEPES, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) gelöst. Der pH-Wert dieser Lösung wurde mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt. Wichtig war bei der anschließenden Steril-Filtration, dass die Fixierlösung flusenfrei blieb, um Kontaminationen der Zellkultur zu vermeiden. Je nach Zelltyp wurden Fixierungsprotokolle mit unterschiedlichen Konzentrationen Glutaraldehyd in HEPES verwendet. Vorher wurden die Zellen zwei Mal in 1x PBS gereinigt, um Großteile der Färbelösung auszuwaschen.

Protokoll A: 1,25 % Glutaraldehyd

Rattenneuronen wurden zunächst für 2 h in 1,25 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurde diese Lösung gegen eine 2,5 %ige Glutaraldehydlösung ausgetauscht, in der die Proben ca. 20 h inkubiert blieben. Am nächsten Tag folgte die Ethanol-Austauschreihe, die in Protokoll B beschrieben ist und eine weitere Nacht beinhaltete. Dieses Protokoll war zwar sehr zeitintensiv, gewährleistete aber, dass die Haftung der Zellen am Substrat nach der Fixierung optimal war. Gleichzeitig wurden Schrumpfungseffekte der Zellen durch den Ethanolaustausch minimiert.

Dieses Protokoll ließ sich auch abkürzen durch Weglassen der Vorfixierung in 1,25 % Glutaraldehyd. In der kurzen Variante von Protokoll A wurden die Proben direkt für 4 h in 2,5 % Glutaraldehyd inkubiert, so dass die ersten beiden Schritte der Ethanol-Reihe noch am selben Tag durchgeführt werden konnten.

Protokoll B: 3,5 % Glutaraldehyd

Für HL1- und HEK-Zellen war die Fixierung weniger kritisch als bei Rattenneuronen. Aus

diesem Grund erfolgte die Fixierung hier sogar in 3,5 % Glutaraldehyd für 4 h. Abschließend folgte die Ethanolreihe, die die Proben auf die Kritisch-Punkt-Trocknung vorbereitete. Sukzessive wurde dabei jeweils die Hälfte der Fixierlösung mit Ethanol substituiert, was zu den folgenden Konzentrationen führte:

1. 50 % Ethanol: Inkubation für 2,5 h
2. 75 % Ethanol: Dehydrierung über Nacht bei 4 °C
3. 87,5 % Ethanol: Inkubation für 15 Min
4. 93,8 % Ethanol: Inkubation für 15 Min
5. 96,9 % Ethanol: Inkubation für 15 Min
6. 98,4 % Ethanol: Inkubation für 15 Min

Abschließend wurde bis auf den Flüssigkeitsspiegel auf der Probe die gesamte Lösung mit 100 % Ethanol ersetzt. Hierin verblieben die Proben weitere 15 Min, bis sie in einen Probenhalter aus Edelstahl überführt wurden, der sich ebenfalls in 100 % Ethanol befand. Mit diesem Halter wurden sie dann in die bereits mit 100 % Ethanol gefüllte Kammer der Kritisch-Punkt-Trocknungs-Anlage gestellt (CPD 030, Baltec AG, Liechtenstein). In der Kritisch-Punkt-Trocknungs-Anlage wurde nun das Ethanol in 10 Stufen, die auf 60 Min verteilt waren, gegen CO₂ ausgetauscht. Unter Heizen erfolgte am kritischen Punkt (31 °C bei 73,8 bar) der Umschlag zur Gasphase, und die Trocknung der Proben war abgeschlossen.

Als letzten Schritt der Vorbereitung zur REM-Analyse wurden die Zellproben in einer SCD 004 Sputteranlage der OC Oerlikon Balzers AG (Liechtenstein) mit einer Schicht Platin besputtert, die wenige Nanometer dick war. Diese Schicht diente zur Kontrastverbesserung im Elektronenstrahl.

4.3.4 Zell-Nanostruktur-Schnitte durch fokussierten Ionenstrahl

Für die Untersuchung der Schnittstelle zwischen Zellmembran und Nanostrukturen wurden ausgewählte Zellen unter dem REM mit einem fokussierten Ionenstrahl (Focused Ion Beam, FIB) geschnitten. Diese Methode zur Untersuchung von Zell-Substrat-Schnittstellen wurde bereits von Greve et al. verwendet ^[3]. Die FIB-Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Forschungszentrum Stiftung caesar, Bonn, durchgeführt. Dort wurde ein REM vom Typ Zeiss Gemini 1550 (Carl Zeiss SMT AG, Jena) verwendet, das über eine

FIB-Anlage mit einem Gallium-Ionenstrahl vom Typ XB1540 der Firma Zeiss verfügte. Damit wurden die Proben senkrecht geschnitten (Milling) und unter einem Winkel von 54° analysiert, wie in Abb. 4.12 dargestellt ist. Zusätzlich war durch ein integriertes Gasinjektionssystem (GIS) die selektive Aufbringung von Platin (Pt) oder Wolfram (W) auf die Oberfläche möglich. Hierdurch wurden die Zellen so fixiert, dass sie sich während des Milling-Prozesses nicht vom Substrat ablösten. Gleichzeitig verbesserte die Metallschicht die Kontrasteigenschaften. Mit dem REM konnte die Schnittstelle zwischen den Nanopillars und der Zellmembran sowohl während des Millings in Echtzeit als auch anschließend analysiert werden.

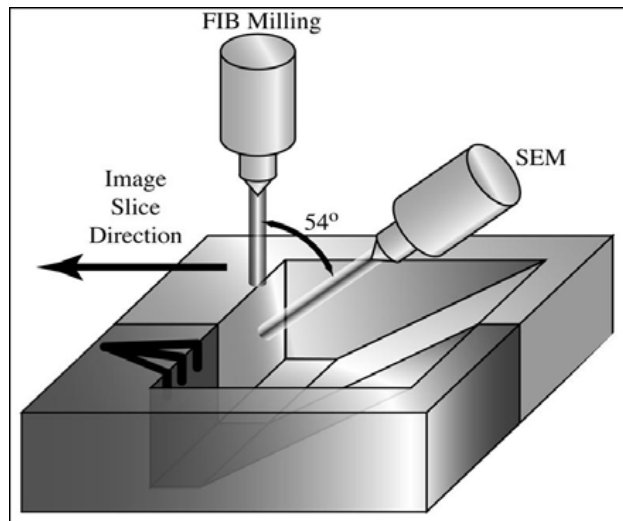


Abbildung 4.12: Schematischer Aufbau des FIB-Equipments ^[99]

4.4 Mikroelektroden-Arrays

4.4.1 Fabrikation im Reinraum

Im Reinraum des Forschungszentrums caesar (Bonn) wurde zunächst mittels Nassoxidation in einem Diffusionsofen des Typs TS-6304 der Firma Tempres Systems Inc. (Heerde,

NL) ein Si-Wafer mit 1500 nm SiO_2 beschichtet. Der Prozess wurde bei 950 °C durchgeführt.

Darauf folgten die nachstehenden Strukturierungsschritte zur Herstellung von MEAs (siehe Abb. 4.13):

1. Auf den SiO_2 -Schichten wurden mit einer Sputteranlage vom Typ ZH 620 der Firma Emerald Technology Ventures AG (Zürich) 10 nm Ti als Adhäsionsschicht, 200 nm Au und noch einmal 10 nm Ti deponiert. Es folgte die Beschichtung mit dem Positivlack AZ 6612 (MicroChemicals GmbH, Ulm), der mit einem Mask-Aligner MA 6 der Firma Süss MicroTec AG (Garching) photolithographisch vorstrukturiert wurde.
2. Anschließend wurden die überschüssigen Metallbereiche und Lackreste trockenätztechnisch mittels Ion Beam Etching (IBE) mit Argon als Prozessgas entfernt. Hierfür kam ein Ionfab 300 Plus-System der Firma Oxford Instruments Plasma Technology (Wiesbaden) zum Einsatz.
3. Auf die SiO_2 -Schicht mit Ti/Au/Ti wurde nun mittels Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition (PECVD) eine elektrisch isolierende Schicht aus SiO_2 und Si_3N_4 (kurz: ONO-Schicht) deponiert. Die oberste Ti-Schicht diente hierbei zur besseren Haftung des ONO-Stapels auf dem vorstrukturierten Wafer. Die verwendete PECVD stammte von der Firma Surface Technology Systems plc (STS, Newport, UK).
Durch Photolithographie wurde die ONO-Schicht nun so strukturiert, dass die Elektrodenbereiche frei lagen, die Leiterbahnen aber weiterhin passiviert waren. An den Rändern der Elektroden verblieb ein schmaler Streifen ONO zur Vermeidung von Kurzschlüssen. Bei diesem photolithographischen Schritt wurde der Lack AZ 1518 der Firma MicroChemicals verwendet.
4. Das Öffnen der ONO-Schicht an den aktiven Elektrodenfenstern erfolgte trockenätztechnisch mittels Reactive Ion Etching (RIE). Für diesen Schritt kam ein Plasma-Ätz-System von STS zum Einsatz, und das Substrat wurde rückseitig mit Helium gekühlt. Die Oxidschichten wurden mit CF_4 und CHF_3 als Prozessgas entfernt, für das Nitrid wurden CF_4 , O_2 und CHF_3 verwendet. Gleichzeitig wurden die oberen 10 nm Ti weggeätzt um einen Kontakt zum darunterliegenden Gold zu erlangen.

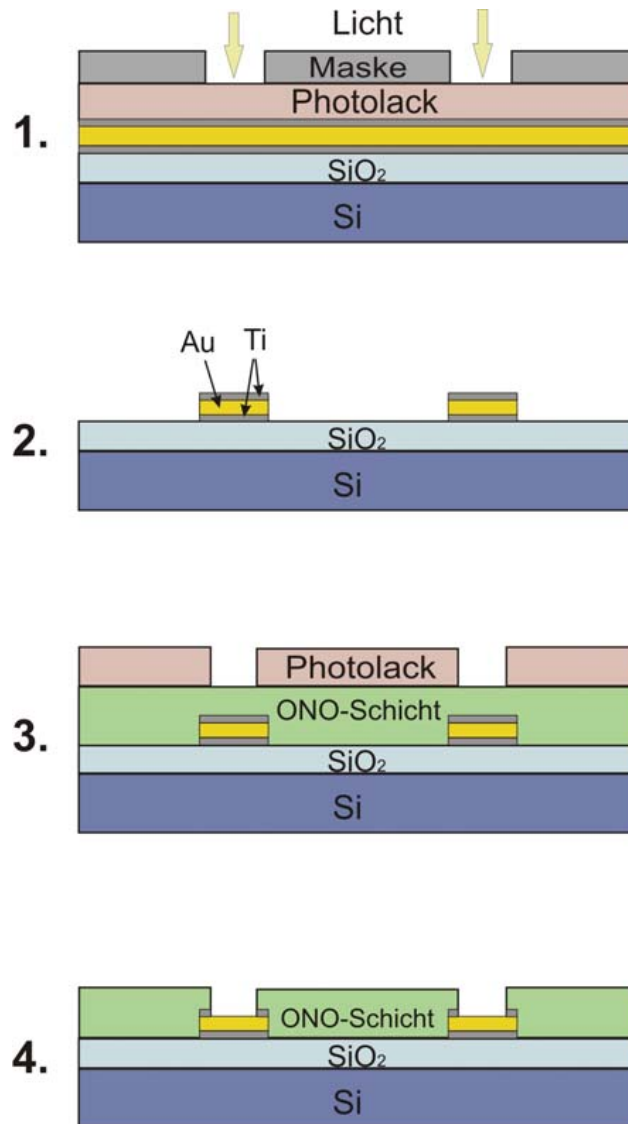


Abbildung 4.13: Herstellung von MEAs auf Si-Substraten mittels Lithographie, Metallisierung und Aufbringen einer Passivierungsschicht

Für die anschließende Nanostrukturierung der Elektrodenbereiche auf den MEAs, wie sie in Abb. 4.14 dargestellt ist, wurden die passivierten MEAs wie folgt weiter prozessiert:

1. Noch im Reinraum wurde auf die ONO-Schicht mit einem Elektronenstrahlverdampfer ein Aluminiumfilm mit einer Dicke von 800 nm aufgebracht. Die Aufdampfanlage des Modells BAK640 stammte von der Firma Unaxis GmbH (Hanau).
2. Außerhalb des Reinraums wurde diese Aluminiumschicht nun anodisiert, wie bereits in Kapitel 4.1.1 vorgestellt wurde. Standardmäßig wurde für den Ätzprozeß 0,3 M Oxalsäure bei einer Spannung von 40 V verwendet.
3. Nach der Porenerweiterung und der Entfernung der Barrier Layer in 5 wt% Phosphorsäure für ca. 40 Min folgte die Galvanisierung im Goldbad zur Füllung der entstandenen Poren.
4. Im letzten Schritt wurde die Aluminiumoxidmembran in 20 wt% KOH entfernt, so dass auf den Elektrodenfenstern freistehende Pillars verblieben.

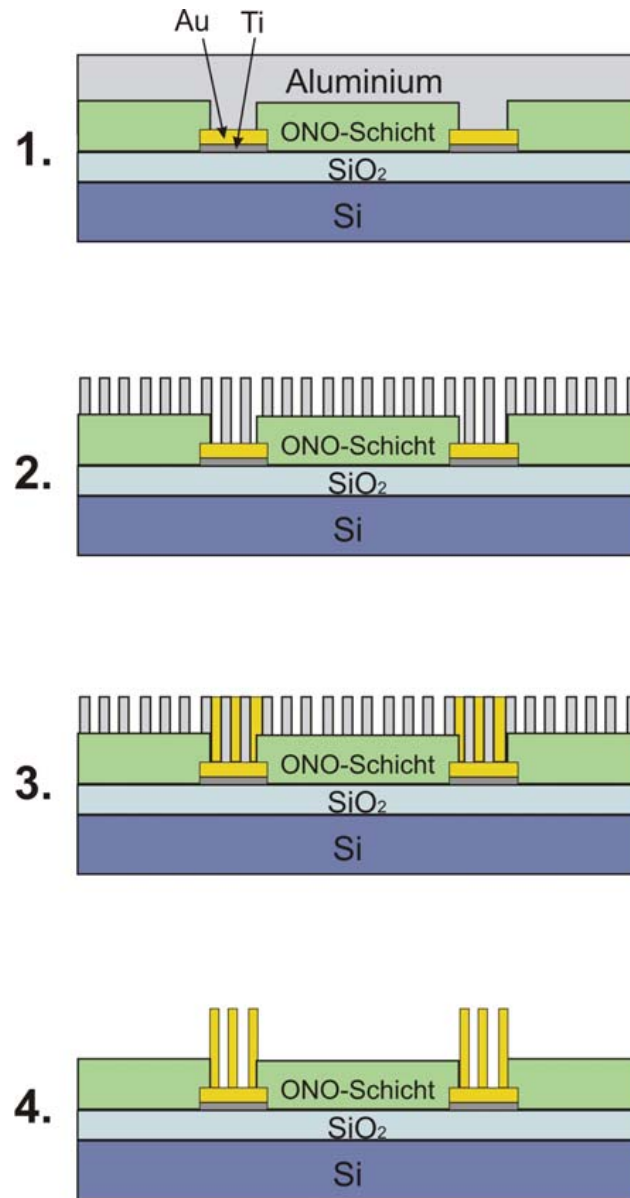


Abbildung 4.14: Herstellung von Gold-Nanopillars auf MEAs durch Anodisierung, Galvanisierung und Ätzen in KOH

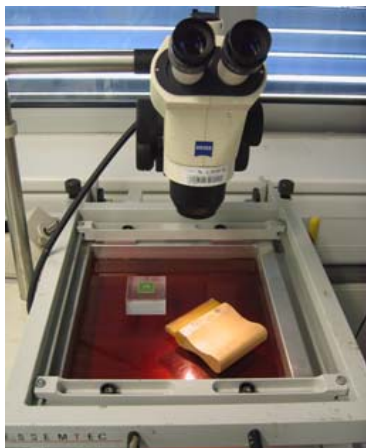
4.4.2 Chip-Aufbau und Verkapselung

Um die MEAs zur Ableitung von Zellsignalen nutzen zu können, mussten sie zunächst elektrisch leitend mit Carrier-Platinen verbunden werden. Anschließend war eine Isolation der Leiterbahnen erforderlich, um während der Messungen einen Kontakt zwischen Leiterbahnen und Zellmedium zu vermeiden.

Der Aufbau der MEA-Chips auf den Carriern wurde in den folgenden Schritten durchgeführt:

1. Wurden planare MEAs verwendet, die zum Sägen mit Schutzlack versehen waren, dann erfolgte zuerst eine Reinigung in Aceton und Isopropanol. MEAs, auf denen durch Anodisierung und Elektrodeposition Gold-Nanopillars entstanden waren, wurden lediglich mit destilliertem Wasser gereinigt und getrocknet.
2. Für den Chipaufbau wurde der Carrier an den Seiten und in der Mitte so gefeilt, dass ein Glasring vom Außendurchmesser 9 mm in das Loch hineinpasste.
3. Danach wurde ein Leitklebstoff (Epo-TEK H20E-PFC, Epoxy Technology, Billarica, USA) aus den Komponenten A und B zu gleichen Teilen angemischt. Mittels Rakel und Positionierungsfolie (s. Abb. 4.15(a)) wurde der Silberkleber auf die Bondpads der Carrier aufgebracht. Kontakte zwischen den einzelnen Bondpads wurden dabei unbedingt vermieden.
4. Mit einem Fineplacer (s. Abb. 4.15(b)) wurde nun der MEA-Chip so auf dem Carrier positioniert, dass die einzelnen Bondpads des Chips über Silberkleber mit den jeweiligen Bondpads auf der Platine elektrisch leitend verbunden waren. Es folgte das Ausbacken des Klebers im Ofen bei 150 °C für 1 h.
5. Im nächsten Schritt wurde der Zweikomponentenkleber U 300 (Epo-Tek, Epoxy Technology, Billarica, USA) im Verhältnis 10:1 von Komponente A zu Komponente B verwendet, um den Chip fest mit dem Carrier zu verbinden. Hierfür wurde der Kleber mit einem Zahnstocher auf der Rückseite des Carriers so an den Chipkanten aufgebracht, dass er die Lücken zwischen den einzelnen Bondpads ausfüllte. Auch dieser Kleber wurde 1 h lang bei 150 °C ausgeheizt.

6. Die Verkapselung der MEA-Chips zur elektrischen Isolierung erfolgte nun mit dem biokompatiblen Kleber PDMS 96-083 (Dow Corning Cooperation, Midland, USA). Auch dieser Kleber wurde im Verhältnis 10:1 von Polymer zu Aushärtungsmittel vorbereitet. Zunächst wurde die Unterseite eines kleinen Glasrings mit PDMS benetzt, und dieser wurde in das Loch des Carriers eingesetzt, so dass er auf dem darunterliegenden Chip haftete. Anschließend wurde ein großer Glasring vom Außendurchmesser 20 mm mit PDMS benetzt und auf der Oberseite des Carriers fixiert. Das Aushärten des Klebers erfolgte wieder bei 150°C für 1 h.
7. Nach der Fixierung der Glasringe wurde die Carrierfläche zwischen den beiden Ringen mit PDMS versehen, da das Platinenmaterial nicht biokompatibel ist. Es folgte die Aushärtung des Klebers (1 h, 150°C).
8. Der letzte Verkapselungsschritt bestand darin, dass die Rückseite des Carriers dort mit PDMS versehen wurde, wo der Kleber U 300 den Chip an der Platine fixierte. Der Kleber U 300 ist ebenfalls nicht biokompatibel und zudem gut löslich in Ethanol, das in der Zellkultur zur Sterilisierung der Chips eingesetzt wird. Daher wurde ein eventueller Kontakt dieses Klebers mit dem Zellmedium durch die PDMS-Schicht vermieden.



(a) Werkzeug zum Aufbringen des Leitsilbers auf die Bondpads der Carrierplatinen



(b) Fineplacer für die Ausrichtung der MEA-Chips auf den Carriern

Abbildung 4.15: Equipment zum Aufbau der MEA-Chips auf Carrierplatinen

Nach dem Aufbau auf den Carriern und der anschließenden Verkapselung waren die Chips, die in Abb. 4.16 zu sehen sind, bereit für Reinigung, Beschichtung und Besiedlung mit Zellen.

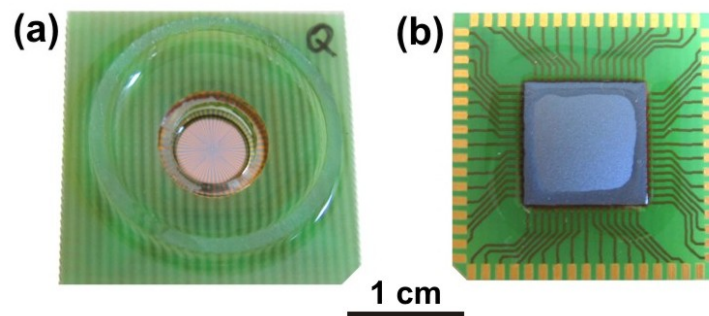


Abbildung 4.16: Verkapserter Chip auf Carrierplatine: (a) Vorderseite, (b) Rückseite

4.5 Ableitung extrazellulärer Signale von Zellkulturen

Aufgrund ihrer dichten Kopplung an Gold-Nanopillar-Arrays wurden HL1-Zellen für die nun folgende Ableitung extrazellulärer Signale ausgewählt. An DIV 4 wurde sowohl mit nanostrukturierten als auch mit planaren MEAs die spontane elektrische Aktivität der HL1-Zellen gemessen. Zur Abschirmung von Störfeldern befand sich der Messaufbau in einem Patch-Stand mit Luftkissen-Tisch, wie er in Abb. 4.17(a) zu sehen ist. Während der Signalableitung wurden die 64 Elektroden auf dem Chip über eine Messbox kontaktiert, die in Abb. 4.17(b) dargestellt ist, und als Referenzelektrode kam eine Ag/AgCl-Elektrode zum Einsatz. Zur Verstärkung der extrazellulären Signale wurde ein Verstärker-System verwendet, das in der elektronischen Werkstatt des IBN-2 angefertigt worden war ^[23].

Die Aufzeichnung der Signale erfolgte mit einem MED 64 System mit der Software MED 64 conductorTM (KF Technology srl, Rom, Italien). Mit dieser Software ließ sich in der Messbox an allen 64 Kanälen gleichzeitig die elektrische Aktivität der HL1-Zellen aufzeichnen, wie in Abb. 4.18 dargestellt ist. Die Messung wurde in HL1-Medium durchgeführt, und bei Bedarf wurde der Neurotransmitter Noradrenalin hinzugegeben, um die Aktivität der HL1-Zellen anzuregen. Hierfür wurden 80 mg Noradrenalin (Sigma) in 25 ml einer 30 mM Lösung aus Ascorbinsäure (Sigma) gelöst. Aus dieser Lösung wurden den 400 μ l



(a) Patch-Stand mit optischem Mikroskop auf Luftkissen-Tisch



(b) Messbox für MEA-Chips mit Ag/AgCl-Elektrode

Abbildung 4.17: Aufbau zur Ableitung extrazellulärer Signale

HL1-Medium im Glasring bei Bedarf wenige Mikroliter hinzugefügt. Über ein optisches Mikroskop konnte während der Messungen die Qualität der HL1-Kultur im Hinblick auf Vitalität und Dichte der Zellen oder eventuelle Kontaminationen kontrolliert werden. Die Signalamplituden der aufgezeichneten Aktionspotenziale von Nanopillar-MEAs wurden anschließend mit den Referenzsignalen an planaren MEAs verglichen.

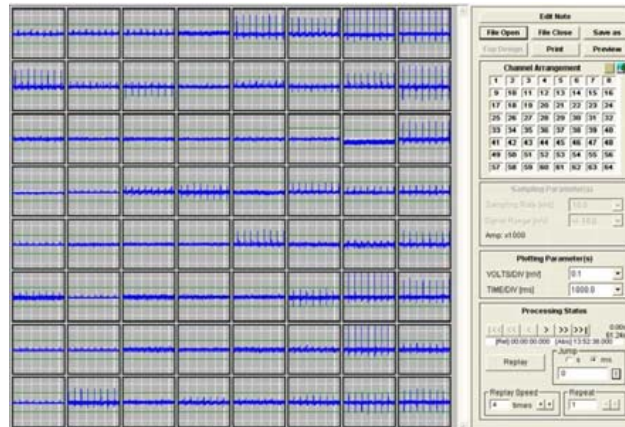


Abbildung 4.18: Aufnahme von Aktionspotenzialen mit der Software MED 64

5 Ergebnisse

5.1 Analyse der Geometrie von Gold-Nanopillar-Arrays mittels Rasterelektronenmikroskopie

Mittels Anodisierung, Porenerweiterung, Galvanisierung und Ätzung in KOH entstanden Gold-Nanopillars, deren Geometrie reproduzierbar eingestellt werden konnte. Dabei ließen sich der Durchmesser und die Abstände zwischen den Pillars durch die Kontrolle der selbstorganisierten Porenentstehung in Aluminiumoxid steuern. Die Anodisierungsparameter Spannung, pH-Wert und Temperatur des Ätzbades sowie die Dauer der anschließenden Porenerweiterung in H_3PO_4 wurden so gewählt, dass Pillars entstanden, wie sie in Abb. 5.1 zu sehen sind. Über die Dauer der anschließenden Galvanisierung wurde die Höhe der Gold-Nanopillars reproduzierbar eingestellt.

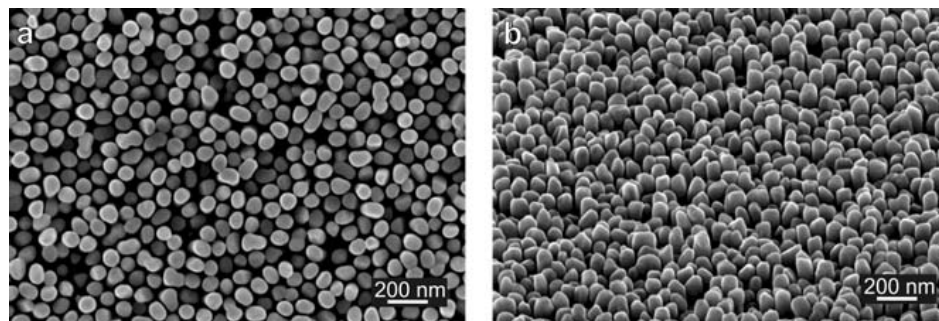


Abbildung 5.1: Array aus Gold-Nanopillars: a) von oben, b) Seitenansicht

Mittels REM-Aufnahmen wurden die geometrischen Abmessungen der Nanopillar-Arrays wiederholt analysiert. Aufgrund dieser Daten wurden der Anodisierungs- und Galvanisierungsprozess dahingehend angepasst, dass Arrays aus gleichmäßig verteilten Pillars mit

möglichst geringer Größenverteilung und regelmäßigen Abständen reproduzierbar hergestellt werden konnten. Zu diesem Zweck wurde aus den REM-Bildern die geometrische Oberfläche der Pillar-Substrate ermittelt. Wie bereits in Kapitel 4.2.2 gezeigt, wurden dabei Pillardurchmesser d_{NP} , Abstand x_{NP} und Höhe h_{NP} bestimmt. Durch Scannen der Pillar-Proben wurde außerdem die jeweilige Grundfläche A_0 ermittelt. Mit Kenntnis dieser Werte ergab sich über Formel 4.1 die geometrische 3D-Oberfläche der Nanopillar-Arrays. Um zu beurteilen, welchen Effekt die Nanostrukturen auf die Vergrößerung der geometrischen Oberfläche im Vergleich zur Grundfläche A_0 haben, wurde der Quotient $\frac{A_{3D}}{A_0}$ bestimmt. Für 12 Nanopillar-Proben mit vergleichbarer Geometrie ist diese Analyse in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Die Gold-Nanopillars in den untersuchten Arrays hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 56 ± 4 nm und waren im Mittel 184 ± 8 nm hoch. Der mittlere Abstand zwischen den Pillars betrug 23 ± 5 nm. Damit war die gesamte Oberfläche der Pillars im Durchschnitt $2,6 \pm 0,3$ cm² groß. Die durchschnittliche Grundfläche A_0 , die bei diesen 12 Proben mit Pillars bewachsen war, betrug $0,26 \pm 0,02$ cm². Im Vergleich zu diesem mittleren Wert für A_0 ergab sich eine mittlere geometrische Vergrößerung der Oberfläche durch Gold-Nanopillars von $9,8 \pm 1,3$.

Probe	A_0 [cm ²]	d_{NP} [nm]	h_{NP} [nm]	x_{NP} [nm]	A_{3D} [cm ²]	$\frac{A_{3D}}{A_0}$
1	0,28	56	174	29	2,1	7,1
2	0,26	55	186	25	2,4	8,8
3	0,22	53	183	18	2,8	12,1
4	0,24	55	186	28	2,2	8,9
5	0,29	64	177	16	2,6	8,7
6	0,26	54	199	20	2,8	10,6
7	0,28	69	185	15	2,6	9,2
8	0,30	73	236	18	3,0	9,8
9	0,24	52	172	24	2,3	9,2
10	0,25	68	234	20	3,0	11,4
11	0,23	50	179	20	2,7	11,1
12	0,26	62	224	23	2,8	10,4
Ø	$0,26 \pm 0,02$	56 ± 4	184 ± 8	23 ± 5	$2,6 \pm 0,3$	$9,8 \pm 1,3$

Tabelle 5.1: Geometrische Untersuchung von Gold-Nanopillars mittels REM. Es wurden Durchmesser d_{NP} und Höhe h_{NP} der Nanopillars bestimmt sowie der Abstand x_{NP} zwischen den äußeren Rändern benachbarter Pillars. Hieraus ergab sich die gesamte Oberfläche A_{3D} des Nanopillar-Arrays. Anschließend wurde hieraus die geometrische Oberflächenvergrößerung durch Nanopillars im Vergleich zur Grundfläche A_0 ermittelt.

Mit dem hier verwendeten Template-gestützten Verfahren ließen sich Gold-Nanostrukturen mit reproduzierbaren Geometrien herstellen. Die anschließende REM-Analyse zeigte außerdem, dass die Nanopillars einen deutlichen Einfluss auf die Vergrößerung der effektiven Goldoberfläche haben.

5.2 Elektrochemische Charakterisierung von Gold-Nanopillar-Elektroden

Zur Bestimmung der elektroaktiven Oberfläche von Gold-Nanopillar-Elektroden wurden verschiedene elektrochemische Methoden in unterschiedlichen Elektrolytsystemen verwendet. Dabei kamen die Methoden der Zyklovoltametrie und Impedanzspektroskopie in 0,15 M Natriumchlorid (NaCl) zum Einsatz. Als diffusionskontrolliertes System wurden zykvoltametrische Untersuchungen mit der redox-aktiven Substanz Kaliumhexacyanoferrat $K_4[Fe(CN)_6]$ durchgeführt.

Für die elektrochemischen Untersuchungen an Pillar-Elektroden wurden nun 8 Proben verwendet, deren geometrische Abmessungen vergleichbar zu den Proben aus Tabelle 5.1 waren und die innerhalb der Standardabweichungen dieser Proben lagen. Als Referenzen wurden planare Goldsubstrate verwendet. Sowohl für die planaren Goldreferenzen als auch für die Nanopillar-Proben mit variablem A_0 wurde als Grundfläche A_{ges} die Fläche $0,35\text{ cm}^2$ zugrunde gelegt, welche durch den Innendurchmesser des O-Rings in der elektrochemischen Zelle bestimmt war. Im elektrochemischen Versuchssystem konnte daher nicht nur die Pillar-Grundfläche A_0 für die Oberflächenvergrößerung berücksichtigt werden. Stattdessen musste die Fläche A_{ges} einfließen, die der O-Ring umschloss und die während der Messungen in Kontakt mit dem Elektrolyten war. Für die Berechnung der elektrochemisch relevanten Oberfläche A_{3D} wurde Formel 4.1 daher verändert zu

$$A_{3D} = A_{ges} + \frac{\pi d_p h A_0}{\sin(60^\circ) d_{int}^2} \quad (5.1)$$

Anschließend wurde für alle 12 Nanopillar-Proben aus Tabelle 5.1 die Oberflächenvergrößerung OV als Quotient aus A_{3D} und A_{ges} bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 5.2 zusammengefasst, und es ergab sich eine elektrochemisch relevante geometrische OV von $7,4 \pm 0,8$ relativ zu A_{ges} . Wie zu erwarten, war dieser Wert kleiner als der zuvor ermittelte Wert von $9,8 \pm 1,3$, da alle Pillar-Grundflächen A_0 kleiner als die Fläche des O-Rings A_{ges} waren.

In den nun folgenden zykvoltametrischen Untersuchungen in NaCl und $K_4[Fe(CN)_6]$ wurden die resultierenden Oberflächenvergrößerungen immer mit der geometrischen OV von $7,4 \pm 0,8$ verglichen.

Probe	A_{3D} [cm ²]	$OV = \frac{A_{3D}}{A_{ges}}$
1	2,1	5,9
2	2,4	6,8
3	2,8	8,0
4	2,2	6,4
5	2,6	7,4
6	2,8	8,1
7	2,6	7,6
8	3,0	8,5
9	2,3	6,6
10	3,0	8,5
11	2,7	7,6
12	2,8	8,0
\emptyset	$2,6 \pm 0,3$	$7,4 \pm 0,8$

Tabelle 5.2: Vergrößerung der geometrischen Fläche von Gold-Nanopillar-Elektroden, die für elektrochemische Untersuchungen relevant ist. A_{3D} wird durch die Fläche $A_{ges} = 0,35 \text{ cm}^2$ des O-Rings in der elektrochemischen Zelle dividiert. Die ermittelte Oberflächenvergrößerung wird als Vergleich für die folgenden elektrochemischen Messungen in NaCl und $K_4[Fe(CN)_6]$ zugrunde gelegt.

5.2.1 Zykvoltametrie

a) Kapazitätsbasierte Zykvoltametrie in 0,15 M NaCl

Die ersten zykvoltametrischen Untersuchungen von nanostrukturierten und planaren Goldflächen in 0,15 M NaCl wurden mit den Scangeschwindigkeiten $v = 20 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$ und $v = 100 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$ durchgeführt. Während dieser Messungen wurde das angelegte Potenzial linear variiert, wodurch der resultierende Strom sich im Punkt $E = 0 \text{ V}$ von $+vC_{dl}$ in positiver Scanrichtung bis $-vC_{dl}$ im negativen Scan änderte. Alle Kurven wurden dabei auf eine projizierte Fläche von 1 cm^2 normiert.

Für $E = 0\text{ V}$ wurde aus den Zyklovoltamogrammen die Differenz der Stromstärken ΔI zwischen dem positiven und dem negativen Potenzialzyklus abgelesen. Für jeweils 3 Zyklen wurden die Ströme gemittelt, und hieraus ergab sich mit Gleichung 3.22 die Doppelschichtkapazität C_{dl}

$$C_{dl} = \frac{\Delta I}{2v} \quad (5.2)$$

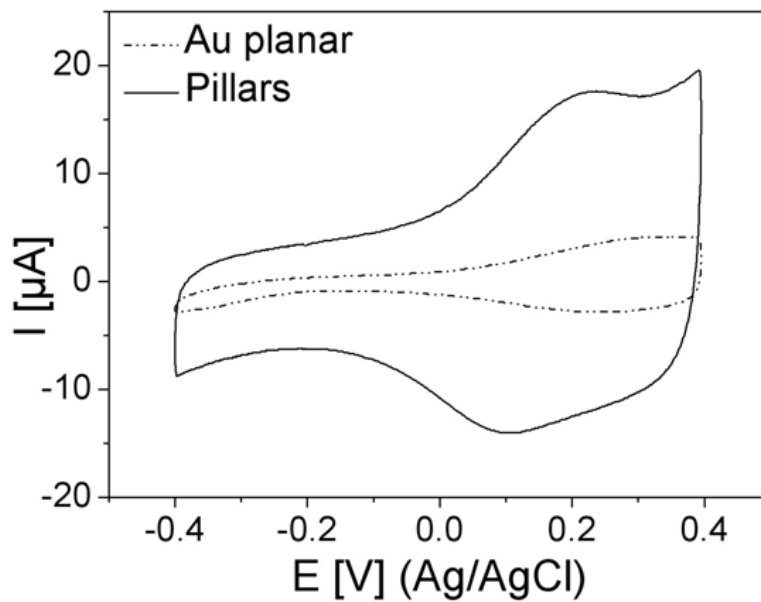


Abbildung 5.2: Zyklovoltamogramm für Gold-Nanopillars und planares Gold, aufgenommen bei $v = 100 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$ in 0,15 M NaCl

Ein exemplarisches Zyklovoltamogramm, das einen Vergleich zwischen Gold-Nanopillars und planarem Gold zeigt, ist in Abb. 5.2 zu sehen. Deutlich zu erkennen ist der Unterschied zwischen den Nanostrukturen und den planaren Substraten: an den Nanopillar-Elektroden (durchgezogene Linie) wurden wesentlich höhere Ströme gemessen als an den planaren Goldflächen (gestrichelte Linie). Dies zeigt, dass die Proben mit Nanopillars aufgrund ihrer erhöhten Oberfläche größere Doppelschichtkapazitäten aufweisen. Im Elektrolyten scheinen allerdings Kontaminationen vorhanden gewesen zu sein, die zu den kleinen Zwischenpeaks bei 0,1 und 0,2 V führten. Diese Peaks wurden wiederholt in den zykovoltametrischen Messungen beobachtet.

Probe	A_0 [cm^2]	$C_{dl}^{v_{20}}$ [μF]	$A_{NP}^{v_{20}}$ [cm^2]	$OV^{v_{20}}$	$C_{dl}^{v_{100}}$ [μF]	$A_{NP}^{v_{100}}$ [cm^2]	$OV^{v_{100}}$
1	0,32	102,5	2,0	5,8	83,0	1,6	4,7
2	0,29	60,0	1,2	3,4	52,0	1,0	3,0
3	0,18	40,0	0,8	2,3	10,0	0,2	0,6
4	0,22	92,5	1,8	5,2	79,0	1,6	4,5
5	0,26	102,5	2,0	5,8	60,5	1,2	3,4
6	0,33	75,0	1,5	4,3	91,0	1,8	5,2
7	0,33	32,5	0,6	1,8	38,5	0,8	2,2
8	0,32	60,0	1,2	3,4	61,0	1,2	3,5
\emptyset	$0,28 \pm 0,05$	$70,6 \pm 25,4$	$1,4 \pm 0,5$	$4,0 \pm 1,4$	$59,4 \pm 24,7$	$1,2 \pm 0,5$	$3,4 \pm 1,4$

Tabelle 5.3: *Zyklovoltametrisch bestimmte Oberflächenvergrößerung für Gold-Nanopillars gemessen in 0,15 M NaCl mit $v = 20 \frac{mV}{s}$ und $v = 100 \frac{mV}{s}$*

Um die effektive Oberflächenvergrößerung mittels Zyklovoltametrie in NaCl zu bestimmen, wurden nun die Zyklovoltamogramme 8 unterschiedlicher Nanopillar-Proben mit denen von 3 planaren Goldflächen verglichen. Die resultierenden Doppelschichtkapazitäten sind für die 8 Pillar-Elektroden in Tabelle 5.3 zu sehen, die Resultate der 3 planaren Goldreferenzen R1 bis R3 sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst. Die hier verwendeten Nanopillar-Elektroden entsprachen in ihrer geometrischen Verteilung den Nanopillars, die in der vorherigen REM-Analyse analysiert wurden. Aus den Zyklovoltametrie-Daten der beiden Scangeschwindigkeiten wurde anschließend die gemittelte Doppelschichtkapazität bestimmt. Bei den Nanopillar-Elektroden betrug $C_{dl}^{v_{20}}$ $70,6 \pm 25,4 \mu F$, und $C_{dl}^{v_{100}}$ lag bei $59,4 \pm 24,7 \mu F$. Daraus ergab sich eine mittlere Kapazität für beide Scangeschwindigkeiten von $65,0 \pm 17,7 \mu F$. Für die planaren Goldreferenzen lagen die Doppelschichtkapazitäten dagegen für beide Scangeschwindigkeiten näher beieinander, und die mittlere Kapazität betrug $17,6 \pm 0,6 \mu F$. Aus diesen Daten ergab sich für Zyklovoltametrie in 0,15 M NaCl eine Oberflächenvergrößerung durch Gold-Nanopillars von $3,7 \pm 1,0$ im Vergleich zu planaren Goldsubstraten.

Probe	$C_{dl}^{v_{20}}$ [μF]	$C_{dl}^{v_{100}}$ [μF]
R1	17,5	16,0
R2	17,5	18,5
R3	18,8	17,5
\emptyset	$17,9 \pm 0,6$	$17,3 \pm 1,0$

Tabelle 5.4: *Kapazitäten für planare Goldsubstrate der Größe $0,35 cm^2$ in 0,15 M NaCl mit $v = 20 \frac{mV}{s}$ und $v = 100 \frac{mV}{s}$*

b) Diffusionskontrollierte Zyklovoltametrie: 0,1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ in 1 M KCl

Für die Untersuchungen eines diffusionskontrollierten Systems wurde die redox-aktive Substanz Kaliumhexacyanoferrat $K_4[Fe(CN)_6]$ verwendet. Der Elektrolyt bestand hierbei aus 0,1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ in 1 M Kaliumchlorid (KCl). In diesem Elektrolyten wurden zykovoltametrische Untersuchungen der Ladungstransfer-Prozesse an den Oberflächen für die Scangeschwindigkeiten $20 \frac{mV}{s}$ und $100 \frac{mV}{s}$ durchgeführt. Anschließend wurde die Kinetik dieses diffusionskontrollierten Systems für verschiedene Scangeschwindigkeiten zwischen $5 \frac{mV}{s}$ und $10000 \frac{mV}{s}$ analysiert.

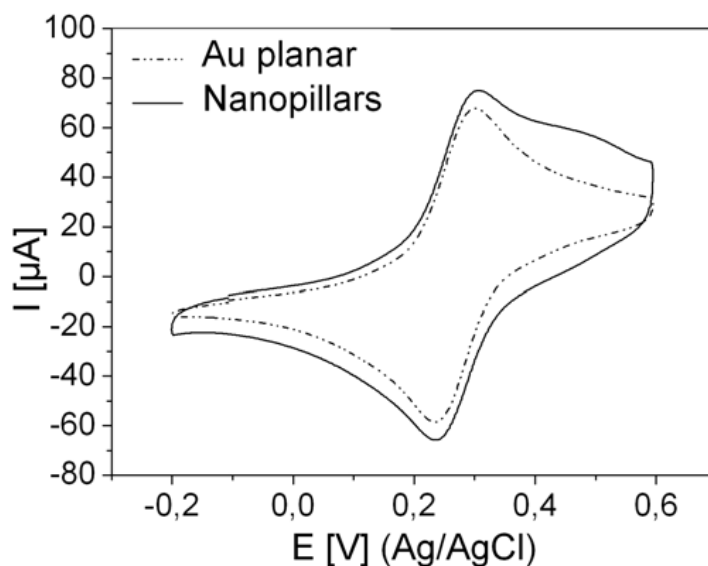


Abbildung 5.3: Zyklovoltamogramme für Gold-Nanopillars und planares Gold, aufgenommen bei $v = 100 \frac{mV}{s}$ in 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ mit 1 M KCl als Background-Elektrolyt

In Abb. 5.3 sind die Zyklovoltamogramme für planares Gold und Gold-Nanopillars in Hexacyanoferrat zu sehen. Daraus ist abzulesen, dass das anodische Peakpotenzial E_a für das Fe^{2+}/Fe^{3+} -Paar bei 0,30 V liegt. Der kathodische Peakstrom wird bei $E_k = 0,24$ V erreicht. Abb. 5.4 zeigt, wie die Höhe der Peakströme ermittelt wurde. Die anfängliche Flanke des Voltamogramms wird in positiver Scanrichtung bis zum Anstieg des Oxidati-

onspeaks durch eine Tangente angenähert. Vom Maximum des Peaks wird nun das Lot auf diese Tangente gefällt und daraus der Peakstrom I_p abgelesen.

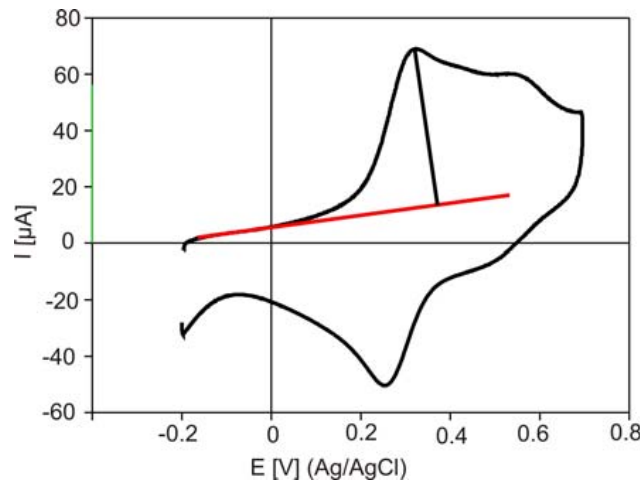


Abbildung 5.4: Bestimmung der Höhe des Peakstroms aus zykelvoltametrischen Kurven, gemessen in $K_4[Fe(CN)_6]$ in 1 M KCl

Für die Pillar-Elektroden sind die Peakströme in Tabelle 5.5 zusammengefasst, für die planaren Referenzen in Tabelle 5.6. Bei einer Scangeschwindigkeit von $20 \frac{mV}{s}$ lag der durchschnittliche Peakstrom für Pillars bei $28,40 \pm 3,23 \mu A$, und bei planarem Gold betrug er $28,03 \pm 0,64 \mu A$. Bei $100 \frac{mV}{s}$ erreichte der mittlere Peakstrom von Gold-Nanopillars den Wert $75,13 \pm 6,74 \mu A$, während er für planares Gold bei $65,77 \pm 2,04 \mu A$ lag. Damit lagen die Peakströme von Nanopillars und planarem Gold für die jeweiligen Scangeschwindigkeiten auffallend nah beieinander. Über Gleichung 5.3 wurde dann die Pillarfläche A_{NP} bestimmt:

$$A_{NP} = 0,35 * \frac{I_p^{NP}}{I_p^{Au}} \quad (5.3)$$

Dabei wurde für I_p^{Au} der Mittelwert der jeweiligen Scangeschwindigkeit verwendet. Aus dem Quotienten $\frac{A_{NP}}{A_{ges}}$ resultierte dann die Oberflächenvergrößerung OV. Die Resultate dieser Berechnungen sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Probe	$I_p^{v_{20}} [\mu A]$	$I_p^{v_{100}} [\mu A]$
1	28,03	68,03
2	24,83	77,93
3	26,48	65,66
4	25,38	70,08
5	25,38	83,93
6	32,55	77,93
7	33,10	85,00
8	31,45	72,50
\emptyset	$28,40 \pm 3,23$	$75,13 \pm 6,74$

Tabelle 5.5: Peakströme ermittelt aus Zyklovoltamogrammen von Gold-Nanopillars bei $v = 20 \frac{mV}{s}$ und $v = 100 \frac{mV}{s}$ in 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ mit 1 M KCl als Background-Elektrolyt

Probe	$I_p^{v_{20}} [\mu A]$	$I_p^{v_{100}} [\mu A]$
R1	27,59	62,35
R2	27,59	67,86
R3	28,14	66,76
R4	27,59	64,55
R5	29,24	67,31
\emptyset	$28,03 \pm 0,64$	$65,77 \pm 2,04$

Tabelle 5.6: Peakströme von planaren Goldsubstraten, zykvoltametrisch gemessen in 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ mit 1 M KCl als Background-Elektrolyt

Die gemittelte Oberfläche der Pillar-Elektroden, bestimmt aus den Daten beider Scangeschwindigkeiten in Hexacyanoferrat, betrug $0,38 \pm 0,01 \text{ cm}^2$. Die OV, die aus den Peakströmen der beiden Scangeschwindigkeiten gemittelt wurde, lag bei $1,08 \pm 0,03$. Demnach war der Gesamtumsatz an den Pillar- und den planaren Elektroden gleich hoch, was darauf hindeutet, dass die Ströme in diesem System diffusionslimitiert waren. Bezogen auf die spezifische Oberfläche war die Reaktion an den Pillaroberflächen jedoch vermindert, da offenbar nicht alle Regionen der Pillars gleichermaßen an der elektrochemischen Reaktion beteiligt waren.

Probe	A_0 [cm^2]	$A_{NP}^{v_{20}}$ [cm^2]	$OV(v_{20})$	$A_{NP}^{v_{100}}$ [cm^2]	$OV(v_{100})$
1	0,32	0,35	1,00	0,36	1,03
2	0,29	0,31	0,89	0,41	1,18
3	0,18	0,33	0,94	0,35	0,99
4	0,22	0,32	0,91	0,37	1,07
5	0,26	0,32	0,91	0,45	1,28
6	0,33	0,41	1,16	0,41	1,18
7	0,33	0,41	1,18	0,45	1,29
8	0,32	0,39	1,12	0,39	1,10
⊙	$0,28 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,04$	$1,01 \pm 0,12$	$0,40 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,10$

Tabelle 5.7: Oberflächenvergrößerung ermittelt aus den Peakströmen, gemessen an Gold-Nanopillars und planaren Goldflächen in 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ mit 1 M KCl Background

v [$\frac{mV}{s}$]	j_p^{Pillar} [$\frac{mA}{cm^2}$]	j_p^{Planar} [$\frac{mA}{cm^2}$]	OV
5	$0,029 \pm 0,002$	$0,026 \pm 0,005$	$1,10 \pm 0,09$
10	$0,043 \pm 0,004$	$0,038 \pm 0,007$	$1,13 \pm 0,12$
20	$0,063 \pm 0,008$	$0,056 \pm 0,002$	$1,13 \pm 0,13$
50	$0,107 \pm 0,014$	$0,092 \pm 0,003$	$1,16 \pm 0,15$
100	$0,159 \pm 0,025$	$0,136 \pm 0,006$	$1,17 \pm 0,18$
200	$0,194 \pm 0,024$	$0,199 \pm 0,009$	$0,98 \pm 0,12$
500	$0,387 \pm 0,066$	$0,331 \pm 0,020$	$1,17 \pm 0,20$
1000	$0,589 \pm 0,028$	$0,501 \pm 0,002$	$1,17 \pm 0,08$
2000	$0,959 \pm 0,159$	$0,734 \pm 0,021$	$1,76 \pm 0,30$
5000	$1,563 \pm 0,327$	$1,230 \pm 0,019$	$1,71 \pm 0,36$
10000	$2,371 \pm 0,623$	$1,840 \pm 0,070$	$1,74 \pm 0,46$

Tabelle 5.8: Abhängigkeit der Peakstromdichten von der Scangeschwindigkeit, gemessen für 2 Pillar- und 2 planare Proben in 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ mit 1 M KCl Background

Um die Grenze des semi-infiniten linearen Diffusionsverhaltens von nanostrukturierten Oberflächen in Hexacyanoferrat nachzuweisen, wurde nun die Abhängigkeit der Peakströme von der Scangeschwindigkeit untersucht. Hierfür wurden 11 Scangeschwindigkeiten zwischen $5 \frac{mV}{s}$ und $10000 \frac{mV}{s}$ gewählt und je zwei Nanopillar-Proben und zwei planare

Goldsubstrate analysiert (s. Tabelle 5.8). Die resultierenden Peakstromdichten wurden gemittelt und gegen die Scangeschwindigkeit aufgetragen, wie in Diagramm 5.5 dargestellt ist. Sowohl für Gold-Nanopillars als auch für planares Gold ließen sich die Verläufe der Peakströme durch Wurzelfunktionen fitten. Für hohe Scangeschwindigkeiten laufen die beiden Kurven zunehmend auseinander, während sie bei niedrigen Geschwindigkeiten, d.h. bei langsamen Elektrodenprozessen, noch miteinander übereinstimmen. Somit zeigten beide Oberflächen in $K_4[Fe(CN)_6]$ ein diffusionslimitiertes Verhalten, wie es in der Cottrell-Gleichung 3.23, die von $\frac{1}{\sqrt{t}}$ abhängt, beschrieben ist.

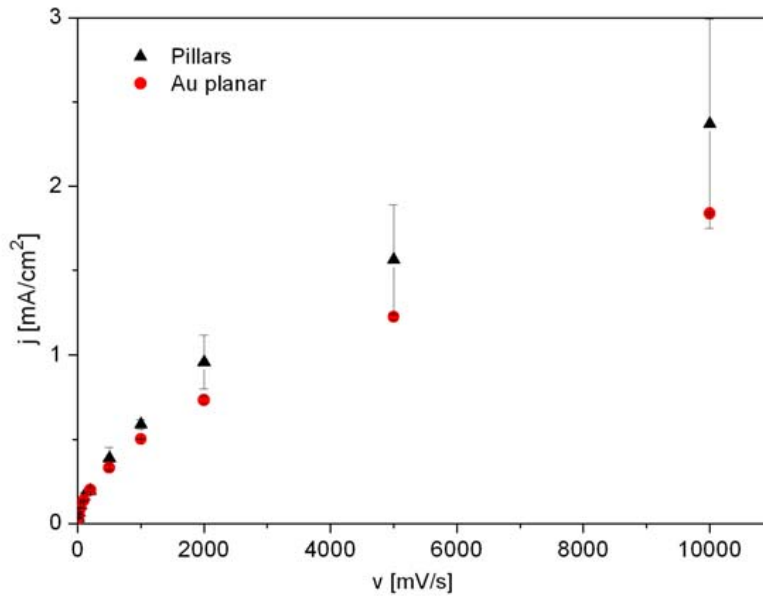


Abbildung 5.5: Abhängigkeit der Stromdichten für Nanopillars und planares Gold von der Scangeschwindigkeit, gemessen zwischen $5 \frac{mV}{s}$ und $10000 \frac{mV}{s}$ in $1 mM K_4[Fe(CN)_6]$ mit $1 M KCl$ Background. Die Stromdichten beider Probenotypen hängen von $\frac{1}{\sqrt{t}}$ ab, was diffusionslimitiertes Verhalten indiziert.

5.2.2 Impedanzspektroskopie

In 0,15 M NaCl wurden nun ebenfalls impedanzspektroskopische Untersuchungen an Gold-Nanopillars und planaren Goldflächen durchgeführt. Im Frequenzbereich zwischen 1 und 10^4 Hz wurden die resultierenden Daten je nach Oberfläche mit unterschiedlichen Ersatzschaltbildern gefittet, aus denen die Impedanz $|Z|$ und die Kapazität C ermittelt wurden.

Die Daten planarer Goldsubstrate wurden mit einem einfachen R-C-Serien-Schaltkreis modelliert. Für die Nanopillar-Elektroden wurde aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur ein serieller Schaltkreis aus einem Widerstand R und einem Constant Phase Element (CPE) verwendet (s. Abbildung 5.6) [34, 35, 61]. Ein CPE ist hilfreich bei der Modellierung der Kapazität von porösen Flächen und liefert die Kapazität C dieser Flächen sowie einen Exponenten α , der ≤ 1 ist.

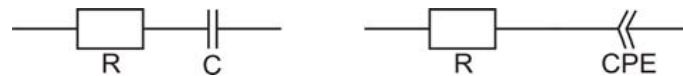


Abbildung 5.6: Ersatzschaltbilder zur Auswertung der Impedanzmessungen

Links: R-C-Serienkreis für planare Goldoberflächen

Rechts: Ersatzschaltbild bestehend aus R und CPE in Serie

Zuerst wurden 8 Gold-Nanopillars und 5 planare Goldflächen in 0,15 M NaCl untersucht, die in ihrer durchschnittlichen Geometrie den Nanopillar-Elektroden aus Tabelle 5.2 entsprachen. In Abbildung 5.7 sind alle Impedanzspektren dieser Proben mit logarithmischer Skala in einem Bode-Plot dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass die Impedanz für niedrige Frequenzen bei planaren Goldproben fast um eine Zehnerpotenz höher liegt als bei Gold-Nanopillars. Damit liegt eine messbare Oberflächenvergrößerung aufgrund der Nanostrukturierung vor. Im Bereich hoher Frequenzen nähern sich die Spektren dem Elektrolytwiderstand an, so dass die Kurven beider Probentypen hier zusammenlaufen. Die zugehörigen Auswertungen der Fits sind in den Tabellen 5.9 und 5.10 zusammengefasst. Für Pillar-Proben wurde so eine Doppelschichtkapazität von $43,8 \pm 0,1 \mu\text{F}$ bestimmt. Bei planarem Gold betrug sie dagegen nur $5,2 \pm 0,1 \mu\text{F}$. Für beide Probentypen lieferten die gewählten Ersatzschaltbilder sehr gute Näherungen, wie die kleinen Fehler der ermittelten Fitparameter belegen.

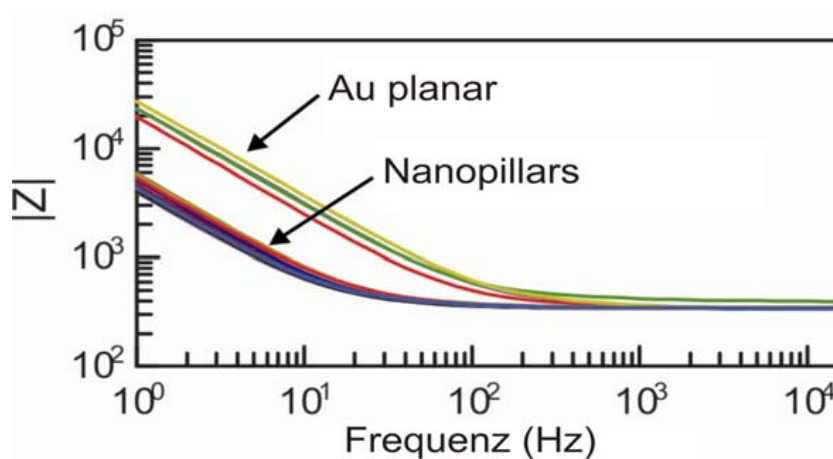


Abbildung 5.7: Impedanzspektren für Gold-Nanopillars und planare Goldsubstrate, gemessen in 0,15 M NaCl. Die Impedanz der planaren Goldflächen war gegenüber den Gold-Nanopillars um eine Zehnerpotenz erhöht.

Probe	R [Ω]	C_{dl} [μF]	α
1	$326,7 \pm 4,5$	$48,8 \pm 0,3$	$0,86 \pm 0,01$
2	$325,9 \pm 5,2$	$44,0 \pm 0,2$	$0,88 \pm 0,02$
3	$327,6 \pm 4,2$	$37,2 \pm 0,1$	$0,91 \pm 0,01$
4	$314,0 \pm 5,4$	$49,6 \pm 0,3$	$0,87 \pm 0,02$
5	$335,1 \pm 4,7$	$33,1 \pm 0,2$	$0,90 \pm 0,01$
6	$329,6 \pm 4,7$	$52,4 \pm 0,3$	$0,89 \pm 0,02$
7	$323,3 \pm 5,9$	$38,0 \pm 0,2$	$0,87 \pm 0,02$
8	$329,7 \pm 5,2$	$47,0 \pm 0,3$	$0,88 \pm 0,02$
Ø	$326,5 \pm 5,0$	$43,8 \pm 0,1$	$0,88 \pm 0,01$

Tabelle 5.9: Ergebnisse der Fits für Gold-Nanopillar-Elektroden in 0,15 M NaCl. Ein R-CPE-Ersatzschaltbild wurde verwendet, um die Daten im Frequenzbereich von 1 Hz bis 10^4 Hz zu fitten.

Probe	R [Ω]	C_{dl} [μF]
R1	$337,0 \pm 7,2$	$5,0 \pm 0,1$
R2	$343,5 \pm 6,5$	$6,6 \pm 0,2$
R3	$320,4 \pm 8,3$	$4,5 \pm 0,1$
R4	$386,4 \pm 8,9$	$5,4 \pm 0,1$
R5	$321,5 \pm 9,0$	$4,4 \pm 0,1$
\emptyset	$341,8 \pm 8,0$	$5,2 \pm 0,1$

Tabelle 5.10: Ergebnisse der Fits für planare Goldoberflächen in 0,15 M NaCl. Die Daten wurden im Frequenzbereich von 1 Hz bis 10^4 Hz mit einem R-C-Ersatzschaltbild gefittet.

Basierend auf den Doppelschichtkapazitäten aus den Fitauswertungen wurden nun die Oberflächenvergrößerungen pro Probe bestimmt. Hierfür wurden die Doppelschichtkapazitäten C_{dl}^{NP} der acht Nanopillar-Proben und die mittlere Kapazität C_{dl}^{Au} für planares Gold aus Tabelle 5.11 verwendet sowie die Fläche $A_{ges} = 0,35 \text{ cm}^2$ der planaren Goldproben. Die Fläche der Nanopillars, die sich aus den Impedanzdaten ergab, wurde bestimmt über die Formel

$$A_{NP} = 0,35 * \frac{C_{dl}^{NP}}{C_{dl}^{Au}} \quad (5.4)$$

Über

$$OV = \frac{A_{NP}}{A_{ges}} \quad (5.5)$$

ergab sich schließlich die Oberflächenvergrößerung pro Probe. Die aus den 8 Pillar-Proben über Impedanzspektroskopie ermittelte Oberflächenvergrößerung betrug $8,4 \pm 1,2$. Im Vergleich zu den vorherigen zykovoltametrischen Untersuchungen in NaCl ($OV = 3,7 \pm 1,0$) ist dieser Wert mehr als doppelt so hoch und ist sogar geringfügig größer als die geometrisch bestimmte Vergrößerung von $7,4 \pm 0,8$.

Probe	A_0 [cm^2]	A_{NP} [cm^2]	OV
1	0,32	3,3	9,4
2	0,29	3,0	8,5
3	0,18	2,5	7,2
4	0,22	3,3	9,5
5	0,26	2,2	6,4
6	0,33	3,5	10,1
7	0,33	2,6	7,3
8	0,32	3,2	9,0
\emptyset	$0,28 \pm 0,05$	$2,9 \pm 0,4$	$8,4 \pm 1,2$

Tabelle 5.11: Oberflächenvergrößerung von Gold-Nanopillars gegenüber planarem Gold, bestimmt mittels Impedanzspektroskopie von 1 Hz bis 10^4 Hz in 0,15 M NaCl

5.3 Zellwachstum auf Gold-Nanopillar-Oberflächen

Vor der Kopplung von Zellen an nanostrukturierte Gold-Mikroelektroden wurde zunächst das Wachstum der Zellen auf Gold-Nanopillar-Oberflächen untersucht. Hierfür kamen sowohl Primärzellen als auch Zelllinien zum Einsatz, und es wurde der Einfluss unterschiedlicher Beschichtungen studiert. Die verwendeten Gold-Nanopillars waren im Mittel zwischen 300 und 400 nm hoch und hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 60 nm.

5.3.1 Grillenneuronen

Am Anfang der Zellkulturexperimente standen Versuche mit Grillenneuronen, die sowohl auf unbeschichteten Substraten als auch auf Oberflächen mit conA-Beschichtung kultiviert wurden. REM-Aufnahmen von fixierten Grillenneuronen auf unbeschichteten Substraten sind in Abb. 5.8 zu sehen. Das Zellwachstum auf beschichteten Substraten zeigt Abb. 5.9. Die Fixierung der Zellen wurde in beiden Fällen mit 4% Paraformaldehyd in PBS durchgeführt. Anschließend wurden die Substrate in CO_2 kritisch-Punkt-getrocknet.

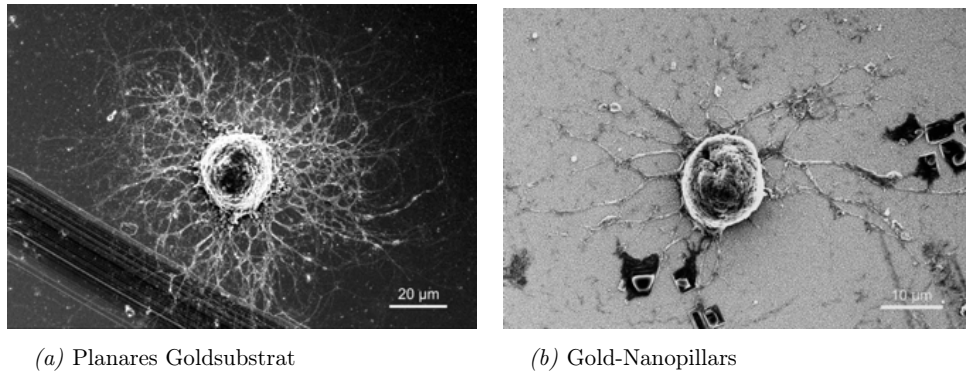


Abbildung 5.8: Grillenneuronen auf unbeschichteten Substraten. Die Dichte vitaler Zellen war sehr gering.

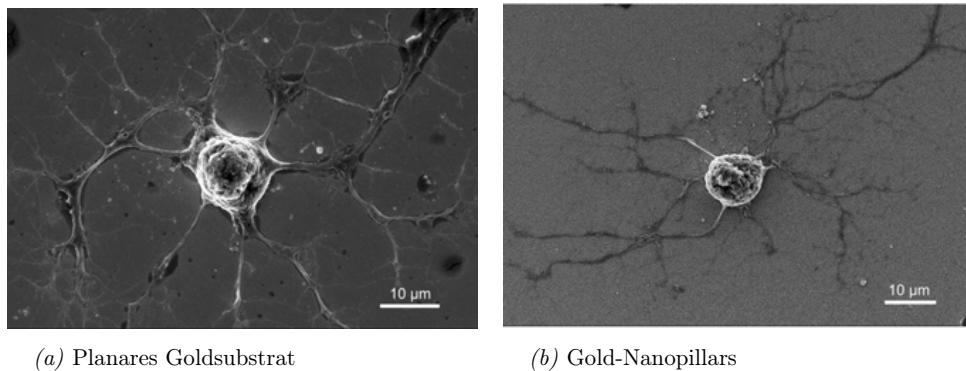
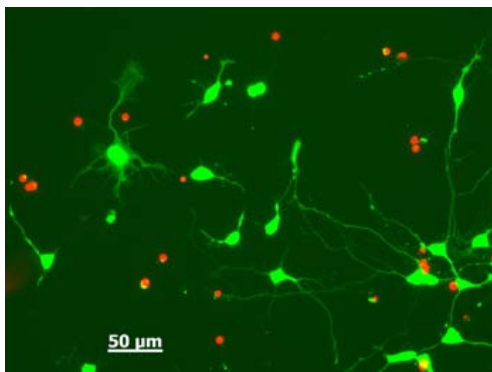


Abbildung 5.9: Grillenneuronen auf Substraten mit conA-Beschichtung. Auch hier war die Zelldichte extrem niedrig.

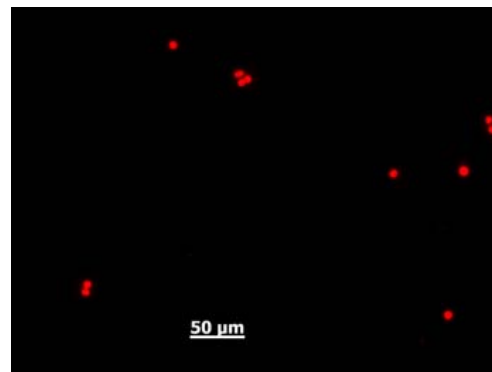
In allen Versuchen waren sowohl auf unbeschichteten als auch auf Substraten mit conA-Beschichtung nur sehr wenige Grillenneuronen zu sehen. Der Großteil dieser Zellen war zudem tot, und es war schwierig, geeignete Zellen für die REM-Analyse auf den Substraten zu finden. Daher scheint diese Art von Neuronen nicht kompatibel mit Gold-Nanopillar-Oberflächen zu sein, so dass im weiteren Verlauf keine Experimente mit Grillenneuronen auf Nanopillars mehr durchgeführt wurden.

5.3.2 Rattenneuronen

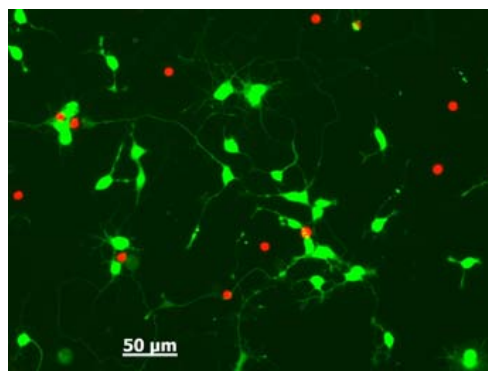
Rattenneuronen wurden zunächst auf nanostrukturierten und planaren Goldsubstraten kultiviert, die mit pLL oder pECM-Gel beschichtet waren. Das Zellwachstum auf den verschiedenen Substraten wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Mit Hilfe der Software ImageJ wurde anschließend die Anzahl der toten und lebenden Zellen pro Probe miteinander verglichen. In den Fluoreszenzbildern erschienen die lebenden Zellen grün durch die Calceinfärbung, während das Ethidiumhomodimer die toten Zellen rot färbte.



(a) Planares Goldsubstrat: vitale Neuronen



(b) Gold-Nanopillars: ausschließlich tote Neuronen



(c) Planarer Aluminiumrand: vitales Neuronenwachstum

Abbildung 5.10: Fluoreszenzfärbung von Rattenneuronen auf pECM an Tag 4. Der Farbstoff Ethidiumhomodimer färbte tote Zellen rot, und vitale Zellen erschienen durch Calceinfärbung grün.

Das resultierende Wachstum der Neuronen an Tag 4 *in vitro* nach Ausplattierung der Zellen (day in vitro = DIV) auf den unterschiedlichen Substratregionen ist für pECM-Beschichtung exemplarisch in Abb. 5.10 dargestellt. Sowohl auf den planaren Goldreferenzen als auch auf dem planaren Al-Rand der Pillar-Proben wuchsen die Neuronen normal und dicht. Allerdings wurden auch in wiederholten Zellkulturen auf keinem Pillar-Array mit pECM-Beschichtung vitale Rattenneuronen an DIV 4 gefunden. Auch bei einer Beschichtung der Nanopillars mit pLL gelang es nicht, darauf Rattenneuronen zu kultivieren, die mehrere Tage überlebten. Eine unterstützende Co-Kultur von Astrozyten konnte die Überlebensrate der Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars ebenfalls nicht verbessern. REM-Aufnahmen von Neuronen auf Pillar-Substraten mit pLL-Beschichtung sind in Abb. 5.11 zu sehen. Die Fixierung erfolgte wiederum mit 4% Paraformaldehyd. Während links auf planarem Gold ein gut adhäriertes Neuron zu erkennen ist, sind auf den Pillars rechts im Bild nur tote Neuronen ohne Neuriten zu erkennen. Aufgrund der negativen Ergebnisse dieser Voruntersuchungen wurde die Beschichtung mit pLL und pECM für Kulturen mit Rattenneuronen auf Gold-Nanostrukturen verworfen, und es wurde nach Alternativen gesucht, die ein vitales Wachstum über mehrere Tage ermöglichten.

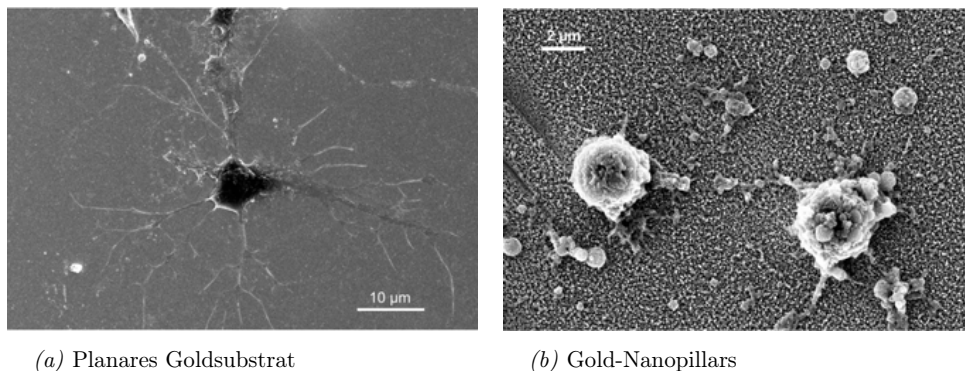


Abbildung 5.11: Rattenneuronen auf Substraten mit pLL-Beschichtung. Auf Nanopillars wurden keine vitalen Neuronen verzeichnet.

Eine erfolgreiche Beschichtungsmethode, die die bisher getesteten Proteinbeschichtungen ablöste, stellten Self-Assembled Monolayers (SAMs) dar. Verschiedene langkettige Alkanthiol-Moleküle mit verschiedenen funktionalen Endgruppen wurden als Beschichtung für Neuronenkulturen verwendet. Es wurden zwei SAM-Typen ausgewählt, mit denen detaillierte Studien zur Zellüberlebensrate durchgeführt wurden: das amino-terminierte

SAM HS-(CH₂)₁₁-NH₂ (kurz: NH₂) sowie eine Mischung aus zwei SAMs mit Ethylenglykolgruppen: HS-(CH₂)₁₁EG₃ und HS-(CH₂)₁₁EG₆NH₂(HCl). Das gemischte SAM wird mit MML (Mixed Monolayer) abgekürzt. Beide SAMs koppeln kovalent über Thiolbindungen an die Gold-Nanopillars und die planaren Goldreferenzen (s. 4.3.1).

Darüber, wie sich die SAM-Beschichtungen auf den planaren Rändern der Pillar-Proben (s. Abb. 4.8) verhalten, liegen derzeit keine gesicherten Erkenntnisse vor. Bisherige Untersuchungen des planaren Probenrandes mittels ToF-SIMS haben ergeben, dass es sich bei diesem Areal um eine legierte Schicht handelt, in der Aluminium und Gold gemischt vorliegen^[96]. Daher wird vermutet, dass der planare Rand eventuell nicht vollständig sondern nur teilweise mit SAMs beschichtet war. Im folgenden wird dieser Bereich zur besseren Unterscheidung der verschiedenen Substrate immer als planarer Al-Rand bezeichnet.

Auch auf den SAM-beschichteten Substraten wurde das Zellwachstum zunächst mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei wurden für planare Goldreferenzen insgesamt 10 Bilder aufgenommen. Proben mit Nanopillars in der Mitte wurden in 10 Bilder auf Nanopillars und 10 weitere Bilder auf dem Aluminiumrand unterteilt. In einigen experimentell bedingten Ausnahmefällen wurden weniger Bilder ausgewertet. Alle Oberflächen wurden später getrennt voneinander analysiert. Für jeden relevanten Bereich (Pillars, Gold, Aluminium) wurde nun der Anteil lebender Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen (LZ) pro Bild ermittelt und in % angegeben:

$$LZ = 100 * \frac{\#Live}{\#Dead + \#Live} \quad (5.6)$$

Die Untersuchung des Wachstums von RCN auf Gold-Nanopillar-Oberflächen und auf planaren Goldreferenzen mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte deutliche Unterschiede für diese beiden Oberflächen. An DIV 4 wurde für unterschiedliche Kulturen eine stark variierende Vitalität der Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars beobachtet. An einigen Versuchstagen kam es zu einem ausgeprägten vitalen Wachstum vieler Neuronen auf Nanopillars, während in anderen Durchläufen die Überlebensrate auf Nanopillars nur sehr gering war oder sogar gegen Null tendierte. Unabhängig hiervon wurde in allen Wiederholungen des Experiments sowohl auf planarem Gold als auch auf dem planaren Al-Rand eine große Anzahl vitaler Neuronen gezählt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aller Oberflächenbereiche an Versuchstagen mit hoher Überlebensrate sind für NH₂ in Abb. 5.12 und für MML in Abb. 5.13 dargestellt. Sowohl auf den Nanostrukturen als auch auf den planaren Flächen lag in allen Versuchen keine signifikante Abhängigkeit von der jeweiligen SAM-Beschichtung vor.

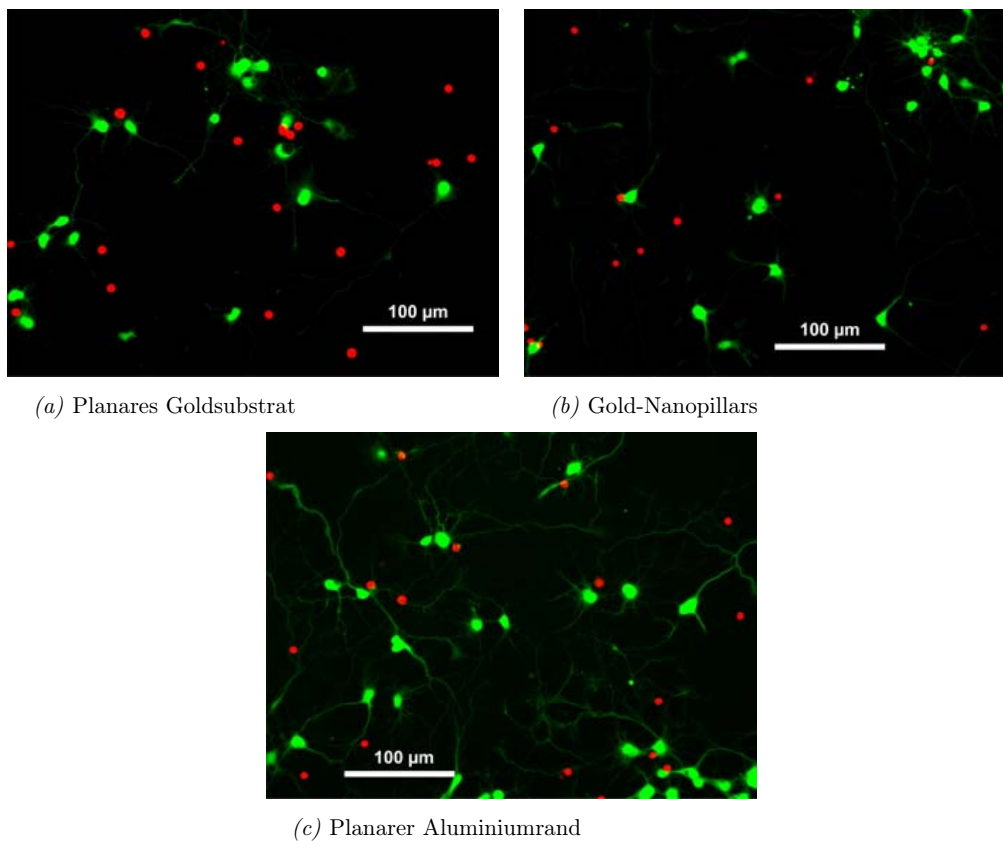


Abbildung 5.12: Fluoreszenzfärbung von Rattenneuronen auf NH_2 -Beschichtung an Tag 4. Hier ist exemplarisch eine hohe Vitalität der Neuronen auf allen Substraten gezeigt.

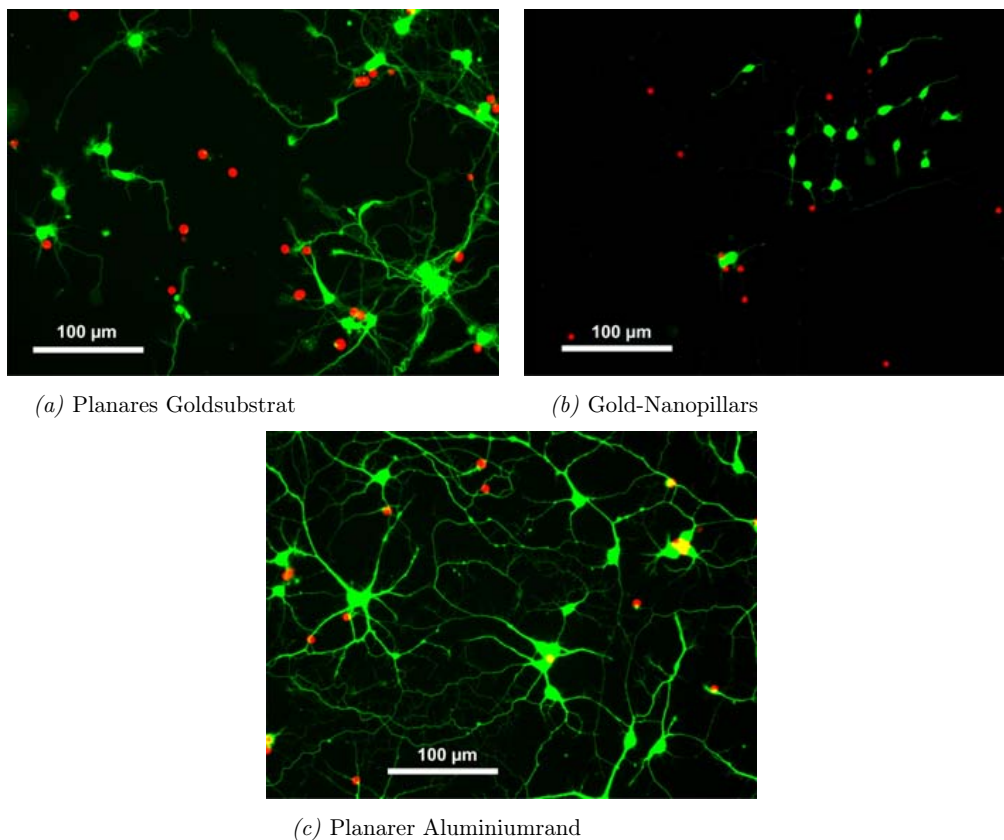


Abbildung 5.13: Fluoreszenzfärbung von Rattenneuronen auf MML-Beschichtung an Tag 4. Exemplarisch sind für alle Substrate Aufnahmen mit hoher Überlebensrate der Neuronen gezeigt.

Aufgrund der bisherigen inkonsistenten Ergebnisse für RCN-Kulturen auf Gold-Nanopillars an DIV 4 wurde die Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie für beide SAM-Beschichtungen auf DIV 7 ausgedehnt. Das deutliche Ergebnis für die drei Substrattypen ist für die Beschichtung mit NH_2 in Abb. 5.14 und für MML in Abb. 5.15 dargestellt.

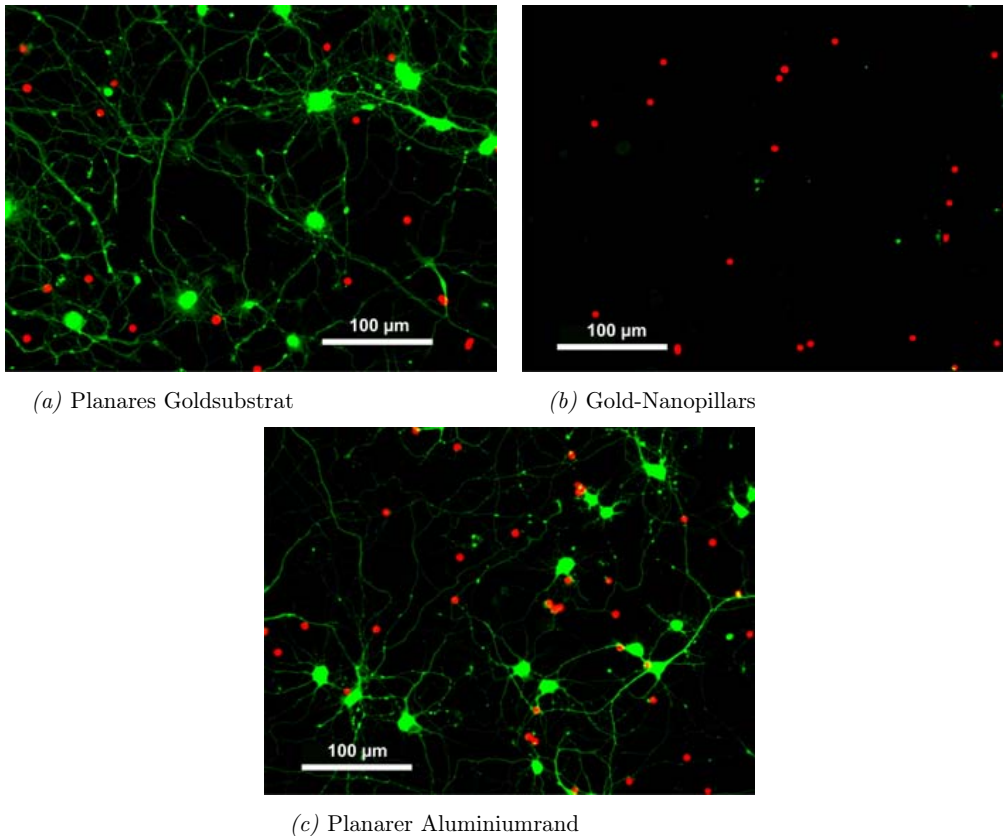


Abbildung 5.14: Fluoreszenzfärbung von Rattenneuronen auf NH_2 -Beschichtung an Tag 7. Die Vitalität auf planarem Au und Al war hoch, während auf Nanopillars keine Neuronen überlebten.

Von den wechselnden Überlebensraten der Rattenneuronen auf Nanopillars an DIV 4 hat bis zu DIV 7 eine klare Entwicklung hin zu einem flächendeckenden Sterben der Neuronen auf Nanopillars stattgefunden. Auf den planaren Al- und Au-Flächen haben sich die RCN-Kulturen dagegen sehr gut weiterentwickelt, und es lag eine ausgeprägte sowie dichte Vernetzung der Neuronen vor. Diese Beobachtungen waren wiederum unabhängig vom verwendeten SAM-Typ.

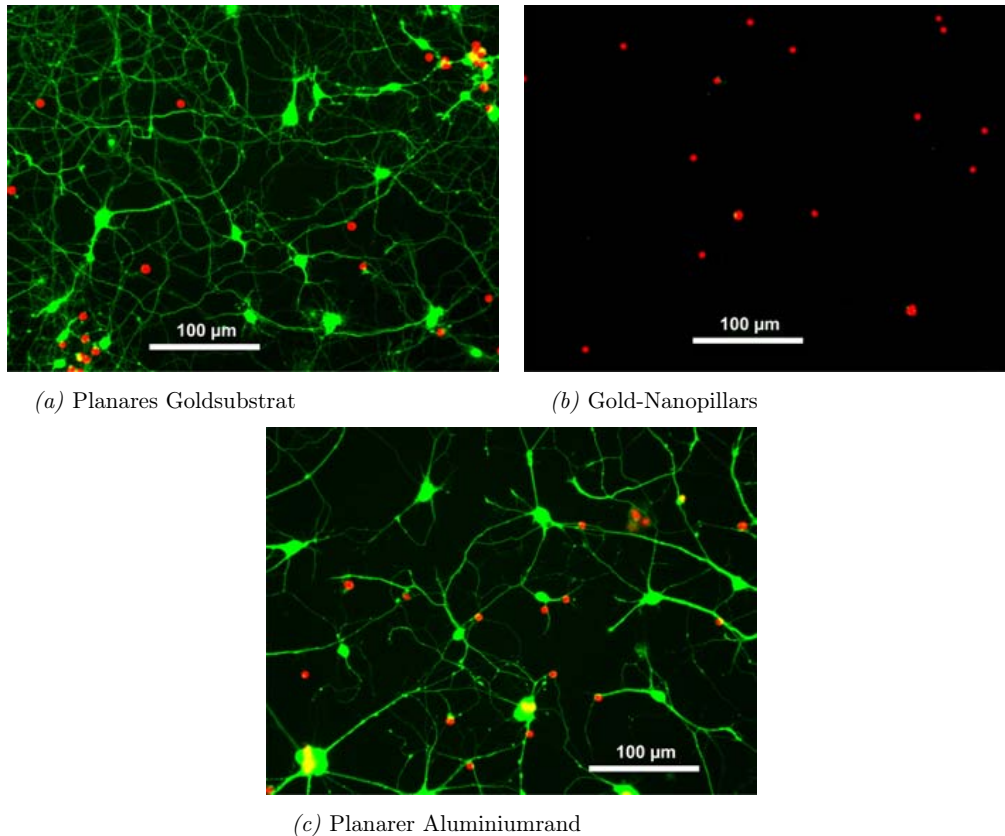


Abbildung 5.15: Fluoreszenzfärbung von Rattenneuronen auf MML-Beschichtung an Tag 7. Auf Nanopillars starben alle Neuronen, wohingegen auf planarem Al und Au vitales Wachstum beobachtet wurde.

Der Trend in der Überlebensrate, der sich für Rattenneuronen abhängig vom Substrat abzeichnet, ist in Abb. 5.16 noch einmal deutlich zu erkennen. Hier ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer RCN-Kultur an Tag 4 auf einer Pillar-Probe mit planarem Al-Rand und MML-Beschichtung zu sehen. In diesem Fall wurde auf dem planaren Al-Rand eine ausgeprägte Neuronen-Vitalität beobachtet, während auf den Gold-Nanopillars kaum lebende Zellen zu sehen sind. Die Aufnahme ist direkt an der Grenze zwischen dem Pillar-Innenbereich und dem Al-Rand entstanden - verdeutlicht durch eine gestrichelte Linie. Klar zu erkennen ist der Unterschied in der Zelldichte in den jeweiligen Substratbe-

reichen. Auf dem Al-Rand wuchsen die Zellen zahlreich mit vielen Neuriten, wohingegen die wenigen Zellen im Pillar-Areal nur vereinzelte Neuriten aufwiesen.

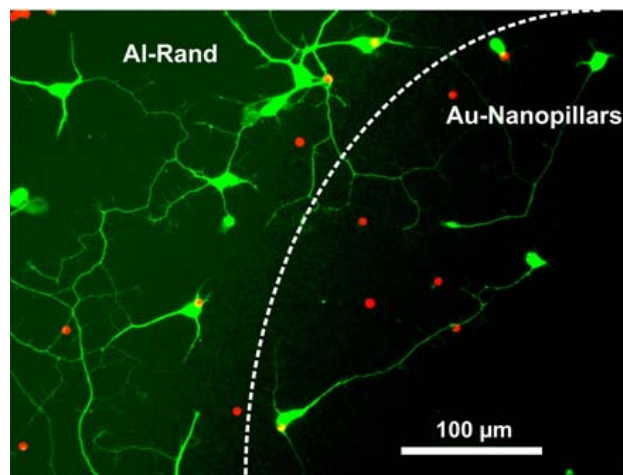


Abbildung 5.16: Neuronenwachstum an der Grenze (gestrichelte Linie) zwischen Gold-Nanopillars und planarem Al-Rand

Einen direkten Vergleich der Zell-Überlebensraten auf planaren Goldsubstraten und Gold-Nanopillars an DIV 4 und DIV 7 zeigt Abb. 5.17 unter Berücksichtigung der beiden SAM-Beschichtungen. Deutlich erkennbar ist an DIV 4 die hohe Vitalität auf planarem Gold für beide SAM-Beschichtungen. Für Neuronen auf planarem Gold mit NH_2 liegt die Vitalität bei 54%. Für Pillars mit NH_2 -Beschichtung beträgt sie dagegen nur 30,4%. Auf planarem Gold mit MML überlebten 51,1% der Neuronen, und auf Pillars mit MML lag die Vitalität sogar nur bei 22%. An DIV 7 ist der Vitalitätsunterschied zwischen den beiden Substrattypen noch stärker ausgeprägt. Mit NH_2 -Beschichtung überlebten auf planarem Gold 38,7% der Neuronen; auf Gold-Nanopillars waren es hingegen 7,4%. Für die Beschichtung mit MML lag die Vitalität der Neuronen auf planaren Goldsubstraten bei 57,7%. Auf Nanopillars mit MML überlebten allerdings nur 5,4% der Neuronen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ablesen, dass Gold-Nanopillars mit der vorliegenden Geometrie (300 - 400 nm hoch und ca. 60 nm Durchmesser) das Wachstum kortikaler Rattenneuronen nicht positiv beeinflussen. Statt die Kopplung an Neuronen zu fördern, kommt es mit zunehmender Dauer der Zellkultivierung offenbar zu einer stark sinkenden Zellvitalität.

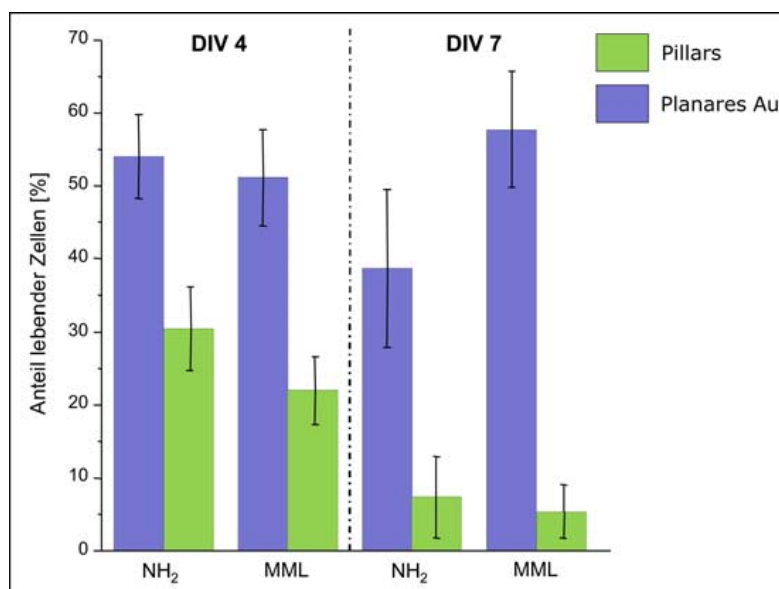


Abbildung 5.17: Überlebensraten von kortikalen Rattenneuronen auf Pillars und planaren Goldflächen mit MML- und NH₂-Beschichtung. Die Vitalität der Neuronen auf Nanopillars nahm von DIV 4 zu DIV 7 hin deutlich ab.

Im Anschluss an die Vitalitäts-Untersuchungen der Neuronenkulturen wurden die Proben, auf denen in der Fluoreszenzfärbung an Tag 4 vitale Neuronen nachgewiesen wurden, wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben, für die anschließende REM-Analyse vorbereitet. Mit der REM-Studie wurde die Morphologie der Neuronen auf den unterschiedlichen Substraten näher untersucht, um hieraus Aufschluss über die stark variierende Vitalität zu erhalten. Exemplarische Aufnahmen von Neuronen auf Gold-Nanopillars an DIV 4 sind in Abb. 5.18 dargestellt. Zu erkennen sind Zellkörper und Neuriten, die sowohl auf als auch zwischen den Nanopillars wuchsen. Wegen der geringen Überlebensrate von RCN auf Gold-Nanopillars zeigte sich dieses Bild allerdings nur selten.

Auf Nanopillars mit einem hohen Anteil toter Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie waren in der folgenden REM-Analyse meist nur noch Neuriten zwischen und auf den Pillars zu erkennen. Adhärierte Zellkörper wurden kaum gefunden, da sie sich wegen mangelnder Adhäsion größtenteils während der Fixierung abgelöst hatten. Eine exemplarische REM-

Aufnahme eines Neurons auf Pillars, bei dem die Neuriten noch adhärirt sind, während der Zellkörper nicht mehr auf den Nanostrukturen haftet, ist in Abb. 5.19 zu sehen.

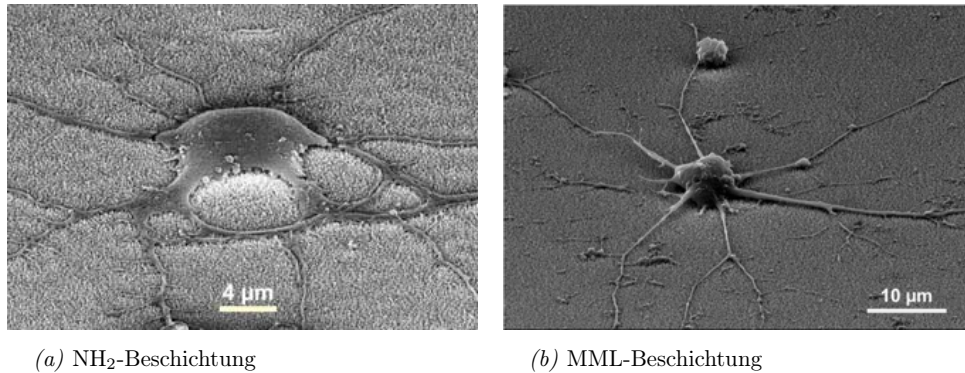


Abbildung 5.18: REM-Aufnahmen von vitalen Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars an DIV 4

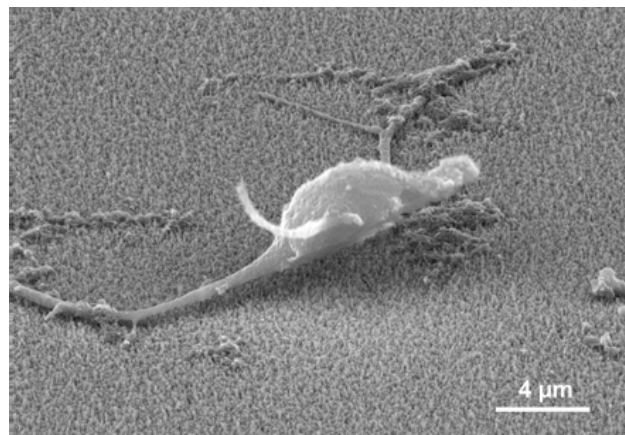


Abbildung 5.19: REM-Aufnahme eines Rattenneurons auf Gold-Nanopillars mit stark adhärirten Neuriten und fehlender Haftung am Zellkörper

Vergleichsweise sind in Abb. 5.20 Rattenneuronen auf planaren Goldsubstraten zu sehen. Auf dem planaren Gold ist das Neuritenwachstum für beide SAM-Beschichtungen besonders stark ausgeprägt, und die Zellkörper befinden sich sehr dicht an der Goldoberfläche,

was auf eine gute Adhäsion hindeutet. Auch in REM-Aufnahmen von Neuronen, die an Tag 7 fixiert wurden, wurde dichtes Wachstum auf planarem Gold beobachtet, das hier nicht gezeigt ist.

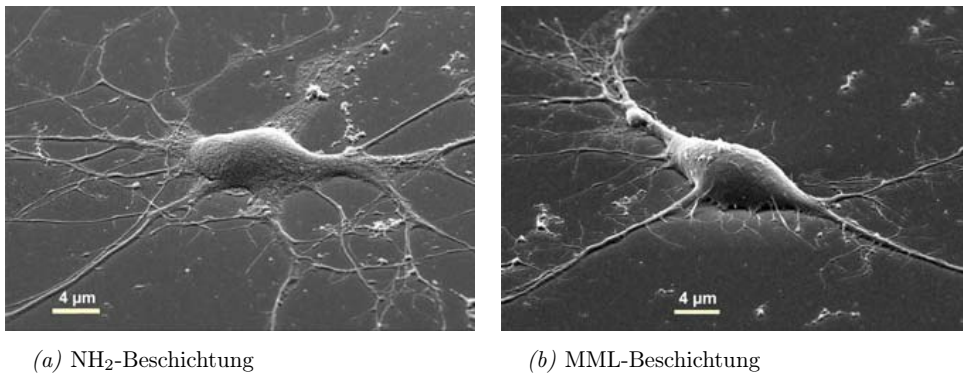


Abbildung 5.20: REM-Aufnahmen von vitalen Rattenneuronen auf planarem Gold an DIV 4

In der REM-Studie wurden außerdem Proben analysiert, die vor den Zellkulturexperimenten lithographisch vorstrukturiert wurden. Auf diesen Proben wechselten sich Pillar-Areale und planare Bereiche ab. Diese Struktur diente zum besseren Verständnis der Adhäsion neuronaler Zellen in Abhängigkeit vom Substrat. In Abb. 5.21 (a) und (b) ist ein Rattenneuron, das an der Grenze zwischen planarem Substrat und Nanopillars wächst, in der Aufsicht und von der Seite zu sehen. Auf der planaren Oberfläche ist der Kontakt zwischen Neuron und Substrat sehr gut, wie an den Neuriten zu erkennen ist, die sich auf dieser Seite ausbilden. Sobald die Zelle den Bereich mit Gold-Nanopillars erreicht, wird die Adhäsion schlechter. Sie haftet kaum noch auf den Nanostrukturen, und der Abstand zwischen Zellmembran und Pillars vergrößert sich. Erst auf der anderen Seite der Nanopillars, an der das planare Substrat wieder beginnt, bilden sich weiter Neuriten aus, durch die das Neuron auf dem Substrat adhären kann. Abb. 5.21 (c) unterstreicht diese Beobachtungen, denn in der gezeigten Seitenansicht eines Zellkörpers auf Nanopillars sind keine Kontaktpunkte zwischen der Zellmembran und den darunter liegenden Pillarspitzen zu erkennen. Es liegt die Vermutung nahe, dass die substratabhängige Adhäsion der Rattenneuronen für die starken Unterschiede in der Überlebensrate verantwortlich ist.

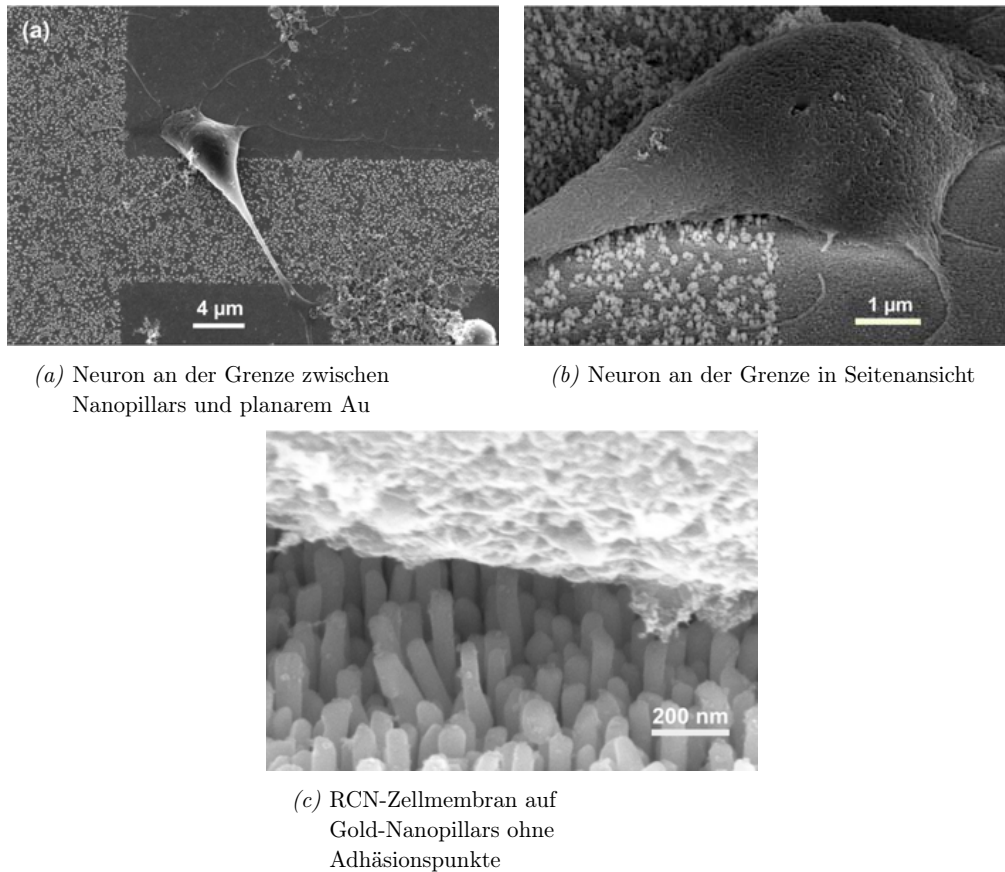


Abbildung 5.21: Verschiedene Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars mit SAM-Beschichtung. Die Zelladhäsion ist auf den Nanostrukturen stark vermindert.

Um weiterführende Erkenntnisse zur Adhäsion von Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars zu erhalten, wurden mit einem fokussierten Gallium-Ionenstrahl Querschnitte von Proben mit fixierten RCN-Kulturen an DIV 4 hergestellt. In Kapitel 4.3.4 ist genauer beschrieben, wie die Querschnitte hierfür präpariert wurden. Um während des Milling-Prozesses keine Ablation der Zellen zu verursachen, wurden sie mit Platin aus dem integrierten Gasinjektionssystem auf dem Substrat fixiert.

Abb. 5.22 zeigt zwei typische Querschnitte durch die Zellkörper von Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars. Im linken Bild ist ein deutlicher Abstand zwischen Zellmembran und Pillarspitzen zu sehen. In der rechten Ansicht ist der Spalt zwar etwas kleiner, allerdings wurden solche Querschnitte nur selten und in den Fällen beobachtet, in denen an DIV 4 vitale Neuronen verzeichnet wurden. Der große Abstand zwischen Zellmembran und Nanopillars war überdies unabhängig davon, ob eine MML- oder eine NH_2 -Beschichtung verwendet wurde.

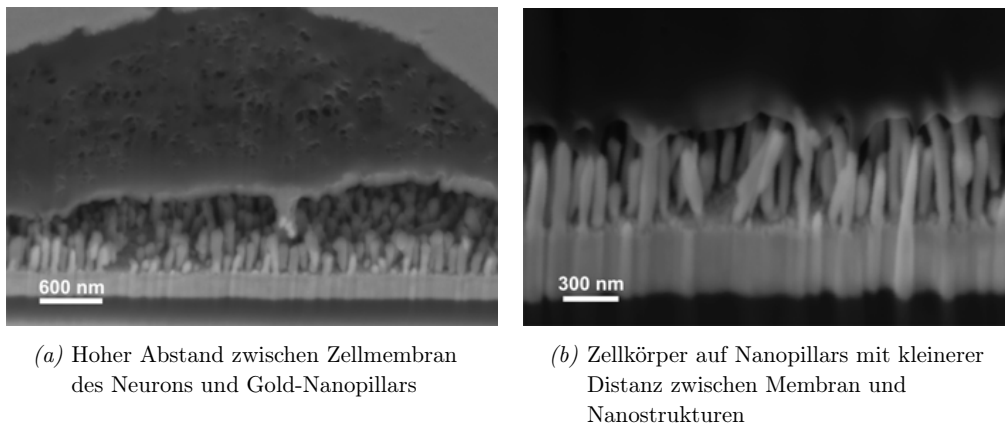
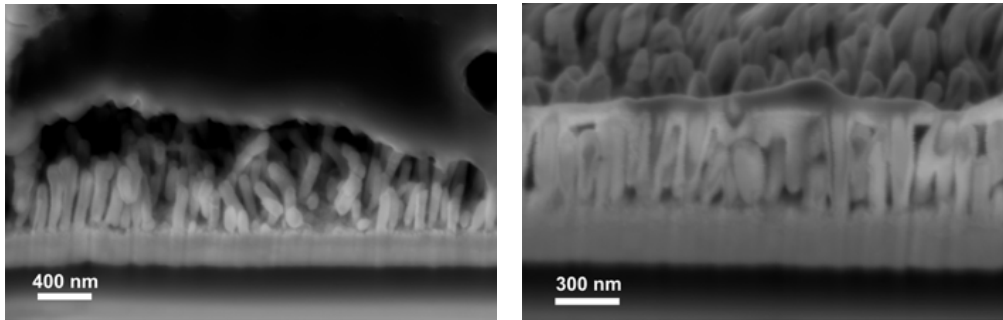


Abbildung 5.22: FIB-Schnitte durch Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars

In den meisten FIB-Messungen wurde für den Zellkörper ein auffallend hoher Abstand zwischen Zelle und Nanostrukturen beobachtet. Bei Schnitten durch die Neuriten-Region ergab sich allerdings ein ganz anderes Bild. Ein direkter Vergleich zwischen Zellkörper und Neurit ist in Abb. 5.23 zu sehen. Der Neurit liegt sehr eng an den Nanopillars an und wuchs teilweise sogar bis in die Zwischenräume der Nanostrukturen hinein. Diese feste Verankerung zwischen Neuriten und Nanopillars gegenüber hohen Abständen der Zellkörper von den Pillars belegt deutlich die vorherigen Beobachtungen aus Fluoreszenzmikroskopie und REM-Analyse.

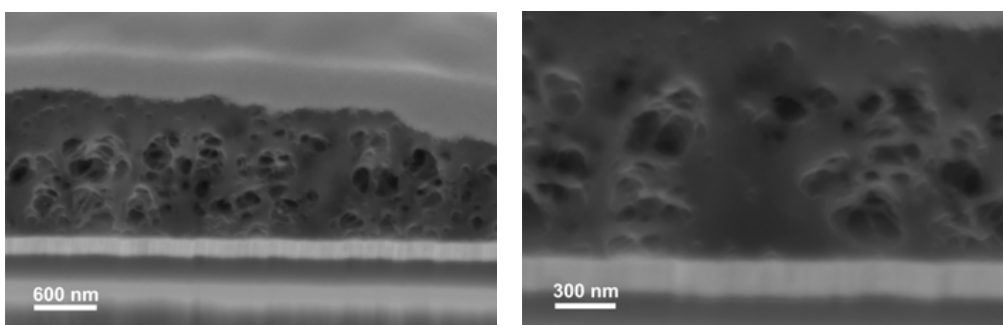


(a) Hoher Abstand zwischen Zellmembran des Neurons und Gold-Nanopillars

(b) Stark arthärierter Neurit auf Gold-Nanostrukturen mit teilweiser Verankerung zwischen den Nanopillars

Abbildung 5.23: FIB-Schnitte durch Zellkörper und Dendrit von Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars

Im Vergleich zu Gold-Nanopillars wurden auch Querschnitte durch RCN auf planarem Gold angefertigt, die in Abb. 5.24 gezeigt sind. Bereits in der Übersichtsaufnahme über die Schnittstelle ist zu erkennen, wie nahe sich der Zellkörper am planaren Substrat befindet. Die Vergrößerung zeigt dann noch deutlicher, dass die Adhäsion für Rattenneuronen auf planarem Gold wesentlich stärker ist als auf Gold-Nanopillars. Auf den Pillars war zwischen Zellmembran und den höchsten Pillars teilweise ein Abstand von 300 bis 400 nm zu verzeichnen, während auf planarem Gold überhaupt kein Abstand sichtbar war.



(a) Querschnitt im Überblick

(b) Vergrößerter Ausschnitt

Abbildung 5.24: FIB-Schnitte durch Rattenneuronen auf planarem Gold: die Neuronen sind stark adhärirt.

Abschließend wurde eine Färbung der Aktinfilamente von Rattenneuronen auf Nanopillars und auf planarem Gold durchgeführt, um eventuelle Veränderungen im Zytoskelett sichtbar zu machen. Wiederum wurden Neuronen auf beiden SAM-Beschichtungen analysiert. Abb. 5.25 gibt einen Überblick über die fluoreszenzmikroskopischen Resultate des Aktin-Stainings von Neuronen, die mit MML-Beschichtung kultiviert wurden.

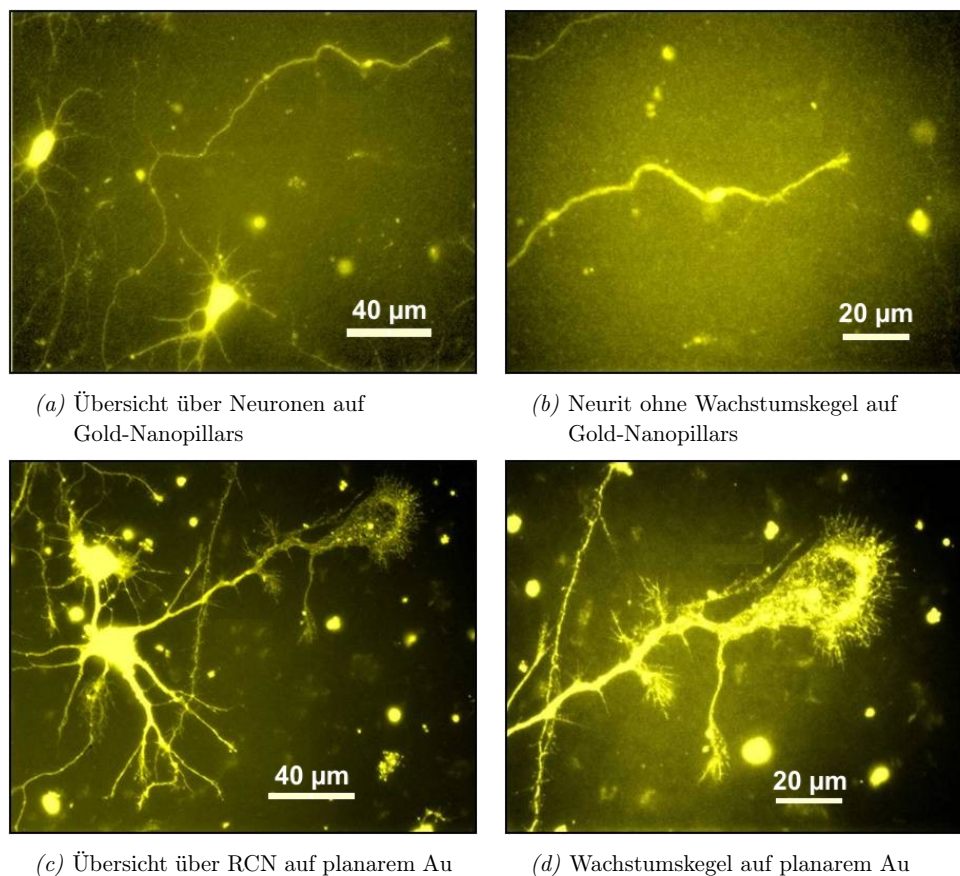


Abbildung 5.25: *Staining der Aktinfilamente von Rattenneuronen mit MML-Beschichtung an Tag 4*

Abb. 5.25(a) zeigt ein Neuron auf Gold-Nanopillars, dessen Neurit in Abb. 5.25(b) vergrößert dargestellt ist. Am Ende des Neurits sind keine weiteren Ausläufer zu sehen. Auf planarem Gold ist dagegen in Abb. 5.25(c) bereits in der Großaufnahme ein Wachstums-

kegel am Neuritenende zu erkennen. Die Vergrößerung in Abb. 5.25(d) zeigt deutlich, wie stark dieser Kegel auf planarem Gold ausgeprägt ist. Sogar an kleineren Neuritenausläufern sind noch Fortsätze sichtbar. Die Unterschiede, die an RCN auf MML-Beschichtung beobachtet wurden, konnten ebenso für NH_2 nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die nanostrukturierten Substrate starken Einfluss nehmen auf die Vorgänge im Zytoskelett, wodurch sich die Zell-Adhäsionsmechanismen ändern.

Eine weitere Hypothese für die niedrige Vitalität von Rattenneuronen auf Gold-Nanopillar-Oberflächen bestand in der Vermutung, dass sich in den Zwischenräumen der Nanopillars noch Reste von Chemikalien aus dem Herstellungsprozess befanden. Da bei der Fabrikation neben verschiedenen Säuren ebenfalls Laugen und Cyanide zum Einsatz kamen, könnten die Neuronen auf diese Substanzen mit einem vermehrten Absterben reagiert haben. Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurden Rattenneuronen auf planaren Goldreferenzen mit pECM-Beschichtung kultiviert, die zuvor verschieden behandelt wurden. In zwei Referenzgruppen wurde die planare Goldoberfläche 120 s lang in einem ($\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$)-Bad galvanisch mit Gold beschichtet. Die Zeit der elektrochemischen Abscheidung wurde gemäß dem Herstellungsprozess der Nanopillars gewählt. In einer der beiden galvanischen Referenzgruppen wurden die Proben anschließend ca. 60 min lang in 20 wt% KOH inkubiert, wie es sonst für die Entfernung der Al_2O_3 -Porenwände erforderlich war. Die dritte Gruppe bildeten planare Goldreferenzen ohne weitere Behandlung. Alle drei Gruppen wurden - wie auch in den vorangegangenen Versuchen die Nanopillars - vor der Proteinbeschichtung mehrere Stunden lang in ultrareinem Wasser gespült und mit UV-Licht sterilisiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung an Goldreferenzen mit pECM-Beschichtung sind in Abb. 5.26 zu sehen. Sowohl auf den unbehandelten Au-Schichten als auch auf den galvanischen Filmen mit und ohne KOH-Behandlung wurden vitale Rattenneuronen beobachtet. Überdies wurden auf allen drei Substrattypen vergleichbar hohe Zelldichten verzeichnet. Demnach kam es auf planaren Goldproben zu keiner Beeinträchtigung des Neuronenwachstums durch verbleibende Kontaminationen von Cyanid oder KOH.

Auch ein weiterer Behandlungsversuch von Nanopillar-Proben in hochkonzentrierter KCl-Lösung zur Entfernung adhärierter Cyanidkomplexe führte bei anschließender Beschichtung der Pillars mit pECM nur zu nicht-vitalen Neuronenkulturen auf den Nanostrukturen. Damit scheinen Geometrie und Topographie der Nanopillars ausschlaggebend zu sein für die Entwicklung der Neuronen.

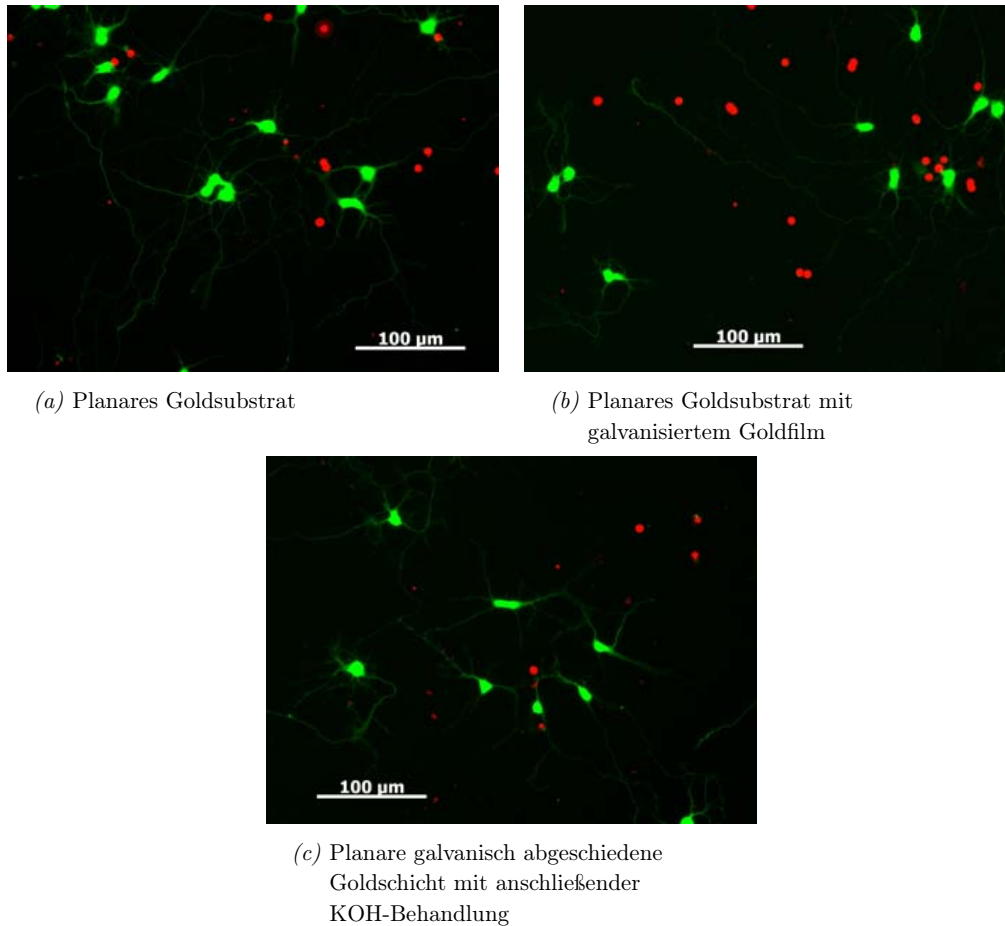


Abbildung 5.26: Fluoreszenzfärbung von Rattenneuronen auf unterschiedlich behandelten planaren Goldreferenzen mit pECM-Beschichtung an Tag 4. Auf allen Substraten fanden sich vitale RCN-Kulturen.

5.3.3 HL1- und HEK-Zellen

Im zweiten Teil der Zellkulturexperimente wurden die beiden Zelllinien HL1 und HEK im Hinblick auf ihre Kopplung an Gold-Nanopillar-Oberflächen untersucht. Im Anschluss wurden die Ergebnisse mit den Beobachtungen an Rattenneuronen verglichen.

An DIV 3 wurden zunächst fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen für HL1-Zellen auf Fibronectin-Beschichtung durchgeführt. Wie Abb. 5.27 zeigt, liegt auf allen drei Substrat-typen ein sehr dichtes vitales Wachstum vor, das wiederholt beobachtet werden konnte.

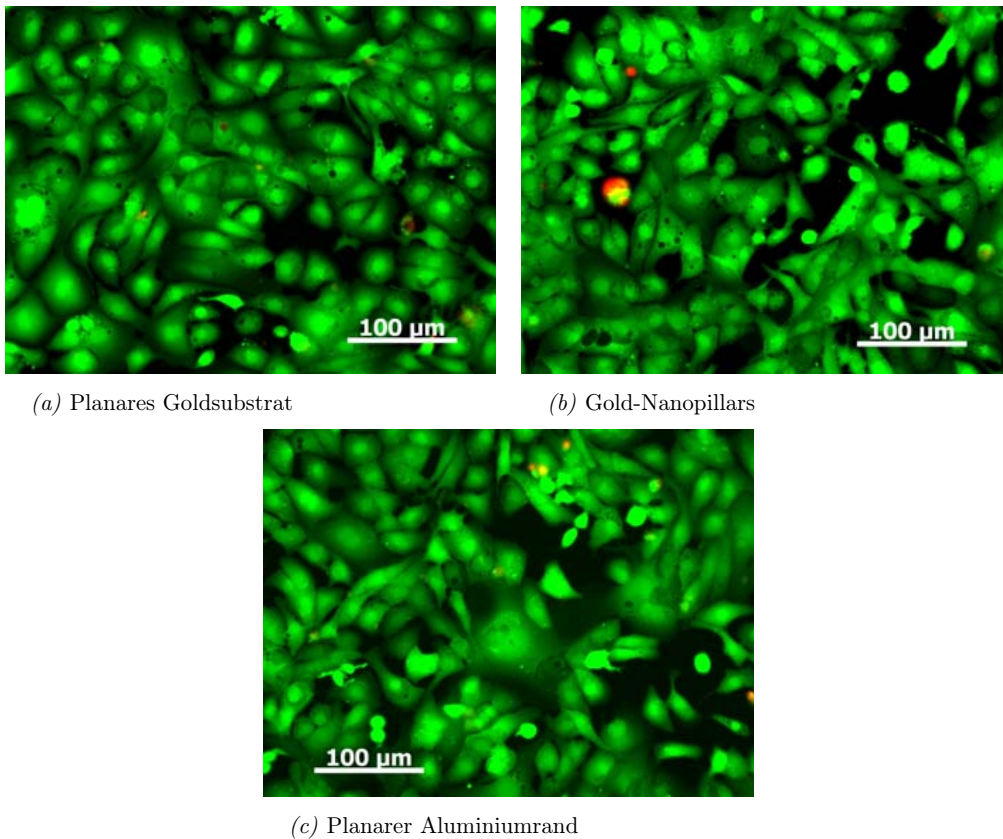


Abbildung 5.27: *Fluoreszenzfärbung von HL1-Zellen mit Fibronectin-Beschichtung an Tag 3. Auf allen Substraten war die Vitalität vergleichbar hoch.*

In den HL1-Kulturen fanden sich zudem kaum tote Zellen. Die Untersuchung von HEK-Kulturen an DIV 3 auf Nanopillars und auf planaren Substraten führte zu vergleichbaren Ergebnissen (s. Abb. 5.28) mit einer hohen Überlebensrate der Zellen auf allen Substraten.

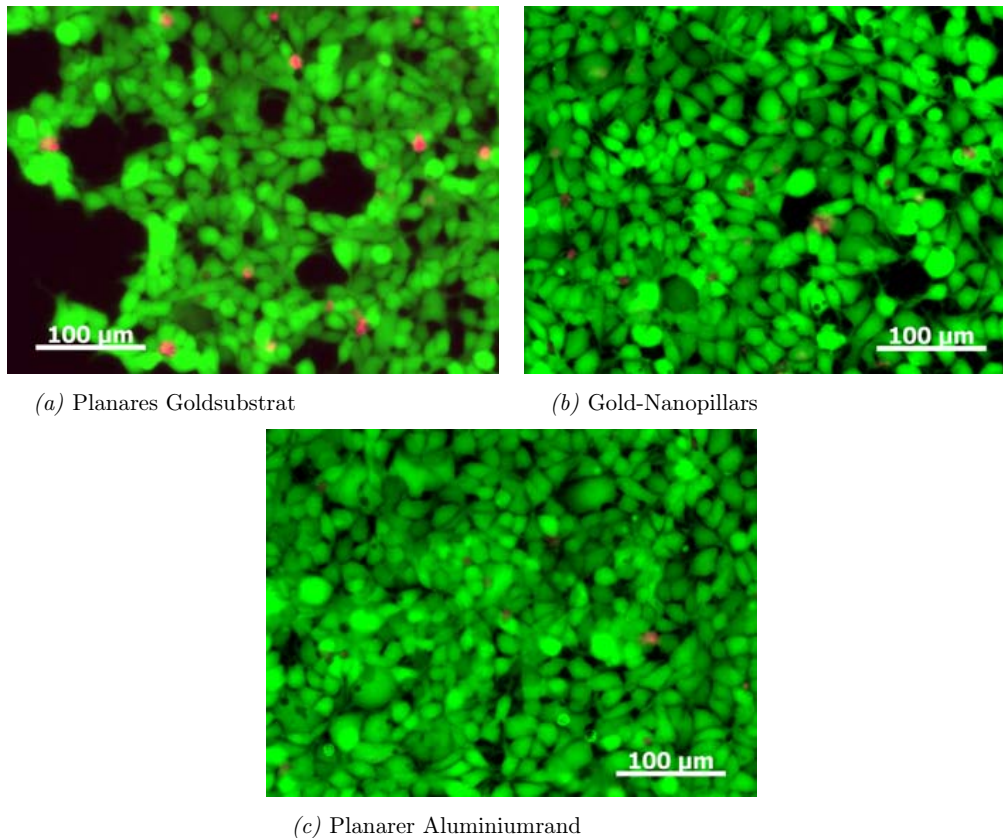
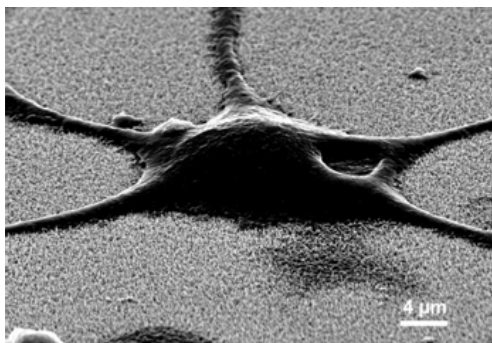


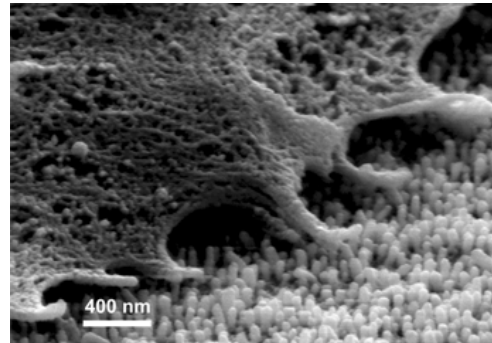
Abbildung 5.28: Fluoreszenzfärbung von HEK-Zellen mit und ohne pLL-Beschichtung an Tag 3. Auch hier überlebten die Zellen auf allen Substraten.

Im Anschluss an das Live-Dead-Staining wurden die beiden Zelltypen auf den jeweiligen Substraten fixiert. Im REM wurde dann unter 0° und 60° die Morphologie der Zellen untersucht. Wie Abb. 5.29 zeigt, wuchsen die HL1-Zellen in engem Kontakt mit den Nanostrukturen. Rechts im Bild zu erkennen sind die Filopodien einer HL1-Zelle, die sich an den darunter liegenden Pillars entlang tasten auf der Suche nach dem nächsten möglichen Adhäsionspunkt. Die REM-Aufnahmen der HEK-Zellen auf Gold-Nanopillars belegen ebenfalls, dass die HEK-Zellen dicht und sehr nahe an den Nanostrukturen wuchsen (s. Abb. 5.30). Als Vergleich sind in Abb. 5.31 REM-Aufnahmen der beiden Zelltypen

auf planarem Gold zu sehen. Auch hier ist zu erkennen, wie dicht die Zellen auf dem Gold wuchsen.

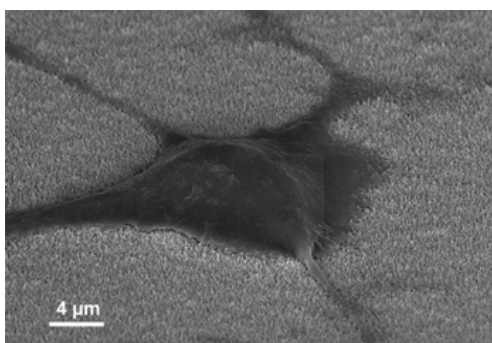


(a) HL1-Zelle auf Pillars

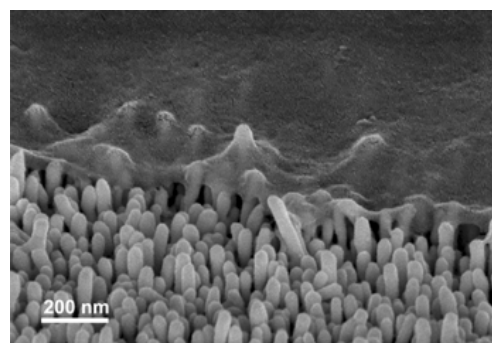


(b) Vergrößerter Ausschnitt

Abbildung 5.29: REM-Aufnahmen von HL1-Zellen auf Gold-Nanopillars mit Fibronectin-Beschichtung an Tag 3

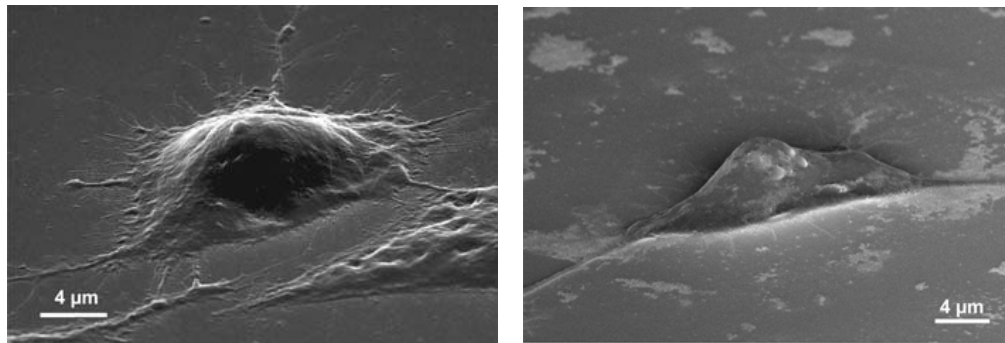


(a) HEK-Zelle auf Pillars



(b) Vergrößerter Ausschnitt

Abbildung 5.30: REM-Aufnahmen von HEK-Zellen auf unbeschichteten Gold-Nanopillars an Tag 3



(a) HL1-Zelle auf planarem Au

(b) HEK-Zelle auf planarem Au

Abbildung 5.31: REM-Aufnahmen von Zelllinien auf planarem Gold an Tag 3

In einer weiteren FIB-Studie wurden Querschnitte der beiden Zelllinien untersucht, um Aufschluss über die Adhäsion dieser Zelltypen auf den verschiedenen Substraten zu erhalten. Abb. 5.32 zeigt die FIB-Schnitte durch HL1-Zellen auf Gold-Nanopillars und auf planarem Gold. Die starke Adhäsion auf planarem Gold ist deutlich zu erkennen. Auffallend ist für die HL1-Zellen, dass auch auf den Gold-Nanopillars kaum ein Spalt zwischen den Pillarspitzen und der Zellmembran zu erkennen ist und die Zelle sogar in das Pillar-Array hinein gesunken ist. Auch bei den HEK-Zellen lag ein dichtes Wachstum entlang der Nanopillars vor, das zwischen den zahlreichen Berührungspunkten zwischen Zellmembran und Pillarspitzen zu erkennen ist (s. Abb. 5.33). Bei HEK-Zellen auf planarem Gold ist - wie für HL1-Zellen - kein Spalt zwischen Zellmembran und Goldoberfläche zu sehen. Für beide Zelllinien lag der Abstand zwischen Pillars und Zellmembran ca. zwischen 0 und 150 nm und war damit deutlich geringer als bei den Neuronen.

In einigen FIB-Aufnahmen der HL1- und HEK-Zellen auf Nanopillars fallen im Grenzbe- reich leicht schattierte Areale direkt an der Zellmembran auf. An diesen Stellen wirkt es, als würden die Pillars in das Zellinnere hineinragen und dabei die Membran durchstoßen. Um zu klären, ob dies tatsächlich der Fall ist, könnten FIB-Lamellen der interessan- ten Bereiche angefertigt werden, die dann im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) untersucht würden. Allerdings stellt sich hierbei die Frage, wie die Hohlräume im Grenz- bereich diese Prozedur überstehen, bei der dann z.B. eine Einbettung in spezielle Harze notwendig wäre.

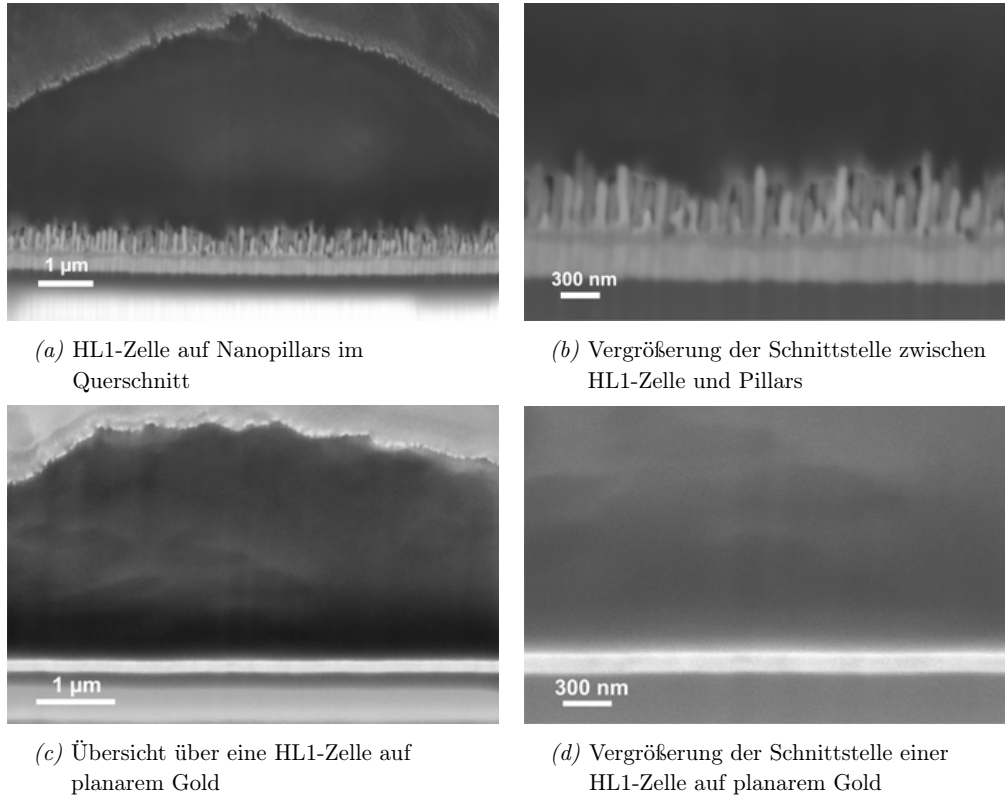


Abbildung 5.32: FIB-Schnitte durch HL1-Zellen auf unterschiedlichen Substraten. Die HL1-Zellen adhärten dicht an Pillars und planares Gold.

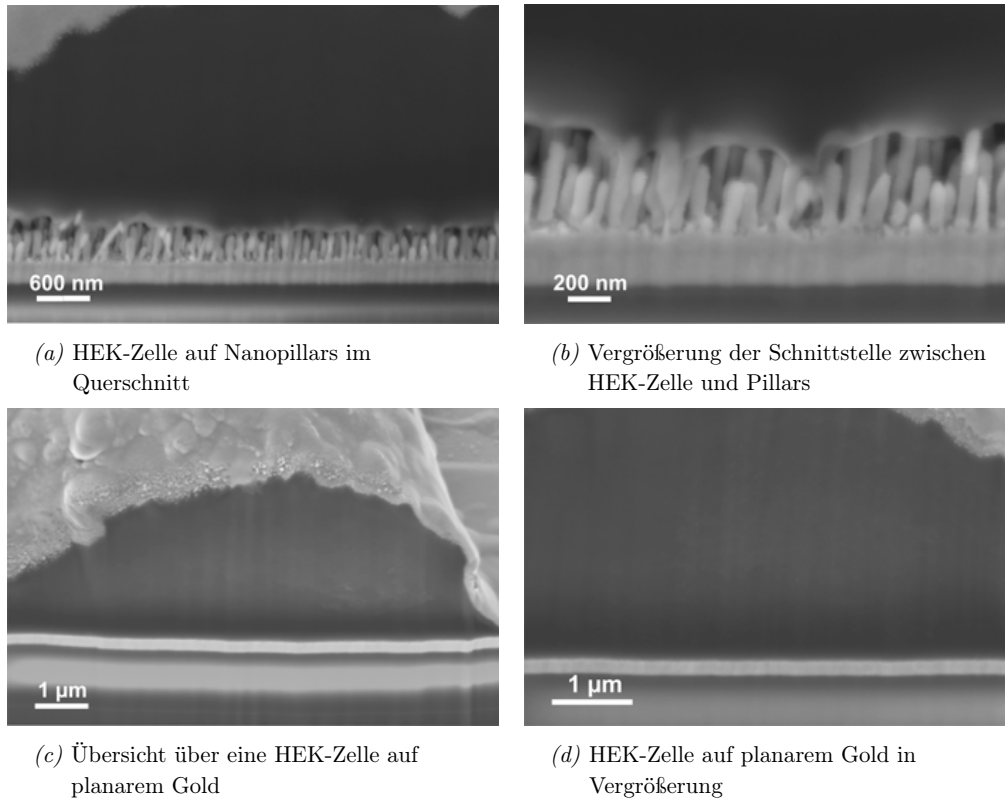


Abbildung 5.33: FIB-Schnitte durch HEK-Zellen auf verschiedenen Substraten. Die HEK-Zellen waren dicht an Pillars und planares Gold adhäriert.

5.4 Nanostrukturierung von Gold-Mikroelektroden

Nachdem die bisherigen Versuche mit großflächigen Gold-Nanopillar-Arrays durchgeführt wurden, wurde der Nanostrukturierungsprozess nun auf Gold-MEAs übertragen, um die planaren Elektrodenfenster mit Nanopillars zu modifizieren. Zunächst wurden für planare MEAs verschiedene Passivierungsschichten aus SiO_2 und Si_3N_4 (kurz: ONO) sowie aus Polymeren und Fotolacken untersucht. Die Passivierungsexperimente, deren Ergebnisse in diesem Kapitel zusammengefasst sind, wurden sowohl im Reinraum des IBN-2 als auch bei externen Partnern durchgeführt.

1) Passivierung mit dem Photolack SU8, deponiert am IBN-2

SU8 ist als Isolierschicht auf Mikrochips bereits etabliert und wurde hier mittels Spincoating mit Schichtdicken von $2\text{ }\mu\text{m}$ und $5\text{ }\mu\text{m}$ auf den Gold-MEAs deponiert. Anschließend wurden diese Chips im Reinraum des IBN-2 thermisch mit 400 nm Aluminium bedampft. Die folgende Anodisierung führte zu regulären Nanoporen (s. Abb. 5.34(a)), allerdings entstanden dabei Risse in der Al_2O_3 -Schicht. Nach Porenerweiterung und Galvanisierung

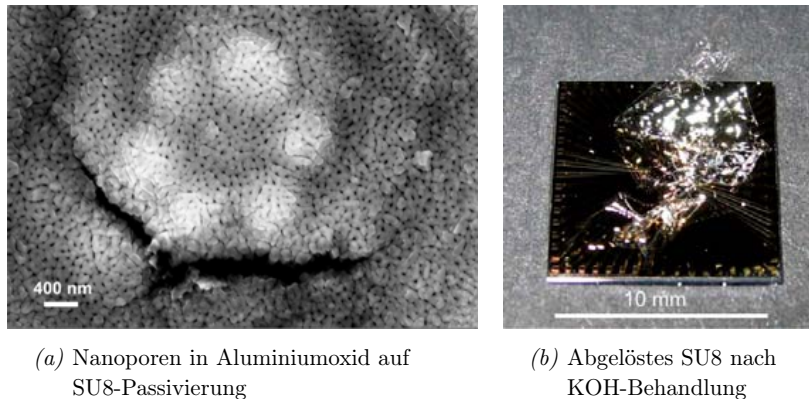


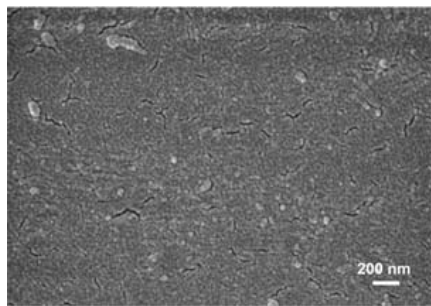
Abbildung 5.34: Passivierung von Gold-MEAs mit SU8

konnten in den SU8-Schichten unter dem optischen Mikroskop zunächst keinerlei Defekte festgestellt werden. Jedoch löste sich beim Entfernen des Aluminiumoxid-Templates in KOH die SU8-Passivierung auf allen Chips komplett ab, wie Abb. 5.34(b) belegt. Dies deutet auf eine schlechte Laugenbeständigkeit der SU8-Filme hin, so dass diese Passivierung für die angestrebte Nanostrukturierung von MEAs verworfen wurde.

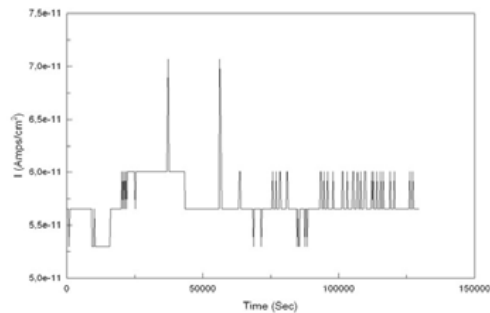
2) Passivierung mit Parylen C, hergestellt am IWE der RWTH Aachen

Am Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik (IWE) der RWTH Aachen wurde mittels Chemical Vapor Deposition (CVD) in einem PDS 2010 Labcoater (Specialty Coating Systems, Indianapolis, USA) das biokompatible und transparente Polymer Parylen C zur Isolierung auf Goldleiterbahnen aufgebracht. Als Schichtdicken wurden $1,5\text{ }\mu\text{m}$ und $3,2\text{ }\mu\text{m}$ gewählt. Für $1,5\text{ }\mu\text{m}$ zeigten sich im REM deutliche Risse in der Parylenschicht (s. Abb. 5.35(a)), und die Schicht war nicht elektrisch isolierend. Für eine Schichtdicke von $3,2\text{ }\mu\text{m}$ wurde dann über 36 h hinweg der Leckstrom durch die Schicht gemessen. Wie Abb. 5.35(b) zeigt, war der Strom bei einer Spannung von 5 V während der gesamten Messung konstant, was auf eine dichte Passivierung hindeutete. Für die Herstellung von Nanopillars auf MEAs mit Parylenpassivierung wäre allerdings eine geringere Dicke der

Passivierung erforderlich, da die Nanopillars sonst wesentlich niedriger wären als die Passivierung und nicht nah genug an die Zellmembran heranreichen würden. Daher konnte diese Isolierschicht nicht zur Passivierung von Nanopillar-MEAs verwendet werden.

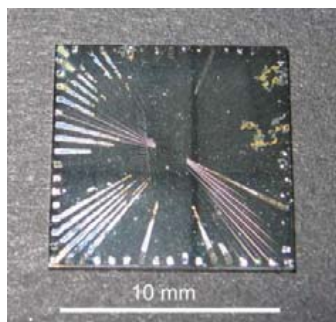


(a) REM-Aufnahme von Rissen in der 1,5 μm dicken Parylenschicht

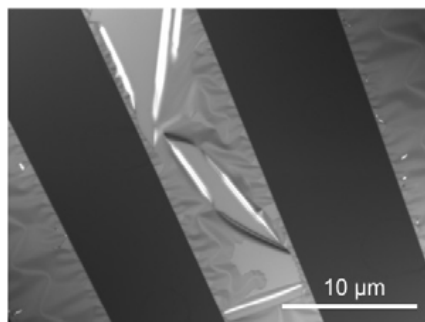


(b) Leckstrom gemessen an einer 3,2 μm dicken Parylenschicht ^[100]

Abbildung 5.35: Passivierung von Gold-Leiterbahnen mit Parylen C



(a) MEA-Chip mit Aluminiumschicht



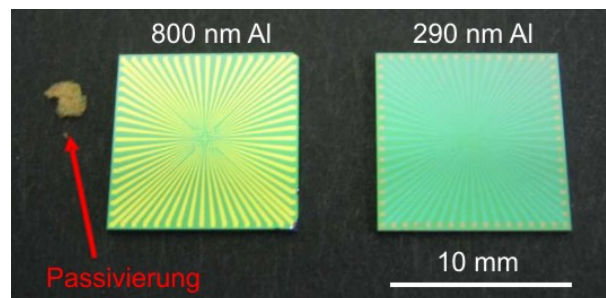
(b) Passivierte Leiterbahnen ohne Aluminiumfilm

Abbildung 5.36: MEA-Chips mit ONO-Schichten des IBN-2

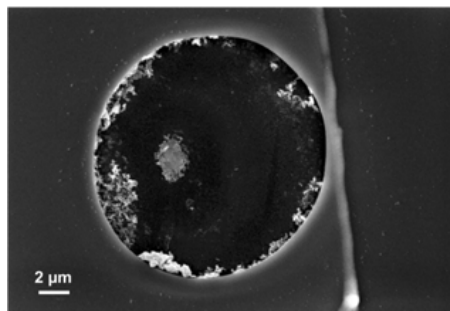
3) ONO-Schicht, prozessiert am IBN-2

Mittels PECVD in einer Plasmalab Anlage von Oxford Instruments Plasma Technology (Wiesbaden) wurden im IBN-2 450 nm und 750 nm dicke ONO-Stapel mit den nachstehenden Abfolgen hergestellt: 100 nm / 150 nm / 100 nm und 300 nm / 150 nm / 300 nm. Für beide Schichttypen traten starke Adhäsionsprobleme der ONO-Passivierung auf den

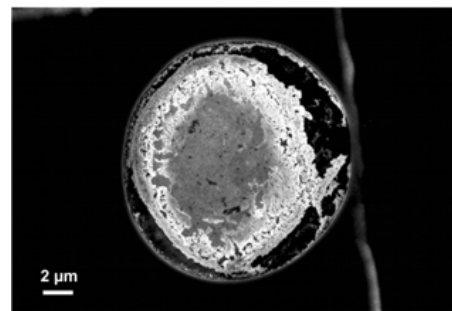
Gold-MEAs auf, wie in Abb. 5.36 zu sehen ist. Die ONO-Filme blättern ab, so dass die darunterliegenden Leiterbahnen nicht mehr isoliert waren. Auch diese Schichten wurden nicht weiter für die Passivierung von MEAs eingesetzt.



(a) Zwei MEA-Chips mit ONO-Schichten von Oxford Instruments nach der Anodisierung



(b) Mikroelektrode ohne Goldabscheidung im REM



(c) REM-Aufnahme von Elektrode mit großflächiger Goldabscheidung

Abbildung 5.37: MEA-Chips mit ONO-Schichten von Oxford Instruments

4) ONO-Schicht, hergestellt bei Oxford Instruments Plasma Technology

ONO-Schichten, die bei Oxford Instruments auf den planaren Jülicher Gold-MEAs deponiert wurden, hatten eine Gesamtdicke von 600 nm mit einer ONO-Schichtfolge von 100 nm / 400 nm / 100 nm. Die Abscheidung der ONO-Schichten wurde in einer Oxford Plasmalab 80+ Anlage durchgeführt. Für die anschließende Anodisierung wurden im Forschungszentrum caesar mit dem Elektronenstrahlverdampfer Aluminiumschichten mit 290 nm und 800 nm Dicke aufgebracht. Auffällig war beim anschließenden Prozess zur Nanostrukturierung der MEAs, dass sich die Passivierung von den Chips löste (s. Abb. 5.37(a)). Die Prozessschritte in Kontakt mit Säuren (Anodisierung und Porenerweiterung) sowie

die Galvanisierung haben diese ONO-Schichten zunächst überstanden. Allerdings kam es wiederum im letzten Schritt, der Entfernung des Aluminiumoxid-Templates in KOH, zur Ablösung der Passivierung. Diese Beobachtung indizierte eine schlechte Beständigkeit der Oxford-Passivierungen gegenüber Laugen. Abb. 5.37(b) und 5.37(c) dokumentieren, dass während der Galvanisierung im Goldbad nur teilweise eine Abscheidung auf den Elektroden stattgefunden hat. Dabei konnten allerdings keine Nanopillars produziert werden, sondern die Abscheidung erfolgte - wenn überhaupt - großflächig. Dieses Resultat legt die Vermutung nahe, dass die Aluminiumschicht nicht vollständig auf den Elektroden gehaftet hat, so dass das Gold während der galvanischen Deposition an den Passivierungskanten unter die Aluminiumschicht gelangen konnte und sich daher nicht in den Poren abschied. Wie in Abb. 5.37(a) zu sehen ist, zeigten die Leiterbahnen auf den Chips nach Nanostrukturierung außerdem unterschiedliche Farben. Für diese Veränderung gibt es bislang keine Erklärung. Auch diese ONO-Schichten schieden aufgrund der schlechten Ergebnisse als Passivierung für nanostrukturierte MEAs aus.

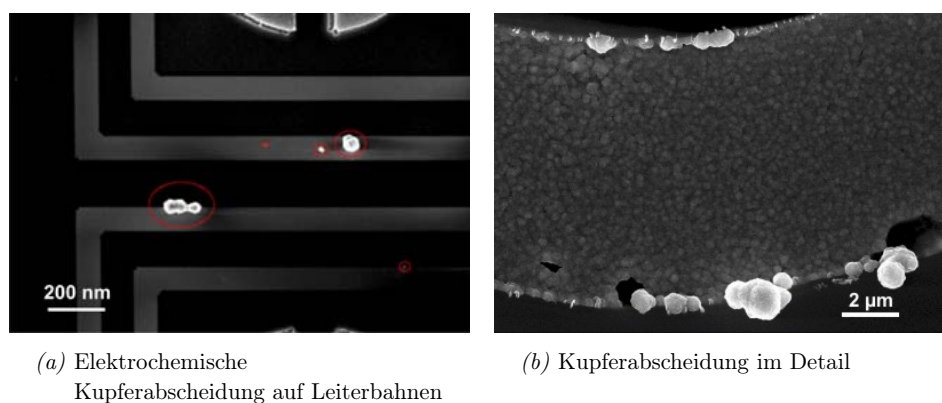


Abbildung 5.38: REM-Aufnahmen elektrochemischer Kupferabscheidung durch Pinholes in der NONONO-Passivierung ^[101]

5) NONONO-Schicht, prozessiert an der FH Zweibrücken

An der FH Zweibrücken wurden mittels PECVD 800 nm dicke NONONO-Schichten auf verschiedenen Gold-Elektroden aus Jülich deponiert mit der folgenden Schichtabfolge: 150 nm / 100 nm / 150 nm / 100 nm / 150 nm / 200 nm. Hierfür wurde ein Plasmalab System 133 der Firma Oxford Instruments Plasma Technology genutzt. Die Isolierfähigkeit dieser Passivierungen wurde mittels elektrochemischer Abscheidung von Kupfer geprüft. In den REM-Aufnahmen in Abb. 5.38 ist zu erkennen, dass die Schichten entgegen einer ersten Prüfung im Lichtmikroskop nicht dicht waren, da in einigen Pinholes Kupfer abge-

schieden wurde. Vor allem an den Rändern der Passivierung kam es zur Abscheidung von Kupfer auf den Elektroden. Aufgrund dieser Isolierungsprobleme und zusätzlicher Schwierigkeiten bei der Herstellung reproduzierbarer Schichtdicken wurden diese Passivierungen nicht für die Prozessierung von Nano-MEAs verwendet.

6) ONO-Schicht, prozessiert am Forschungszentrum caesar, Bonn

Am Forschungszentrum caesar wurde auf planare Gold-MEAs, die zuvor in Jülich prozessiert wurden, in einer PECVD-Anlage von STS eine 800 nm dicke ONO-Schicht deponiert mit der Abfolge 300 nm / 200 nm / 300 nm. Bereits bei ersten Tests zeigte sich, dass diese ONO-Stapel nicht gut auf den MEA-Chips hafteten, da sie direkt abplatzten. Dieser Effekt war vor allem im Bereich der Leiterbahnen zu beobachten (s. Abb. 5.39). Zur Verbesserung der Adhäsion dieser Passivierung waren zuvor sogar wenige Nanometer Chrom bzw. Titan auf den Gold-Leiterbahnen abgeschieden worden. Jedoch konnte auch hierdurch die ONO-Adhäsion nicht verbessert werden. Zusammen mit den Projektpartnern am Forschungszentrum caesar wurden mögliche Problemquellen im Prozess diskutiert. Daraufhin wurde in einem zweiten Versuch der komplette Prozess zur MEA-Herstellung im Reinraum des Forschungszentrums caesar durchgeführt.

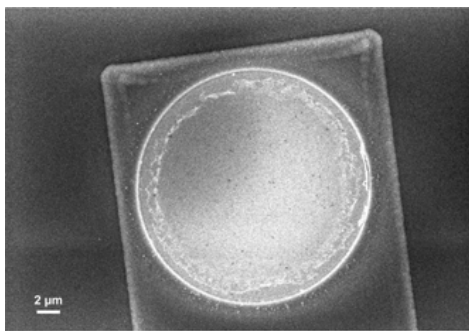


Abbildung 5.39: Mangelnde Haftung der ONO-Schicht von caesar auf Jülicher MEAs

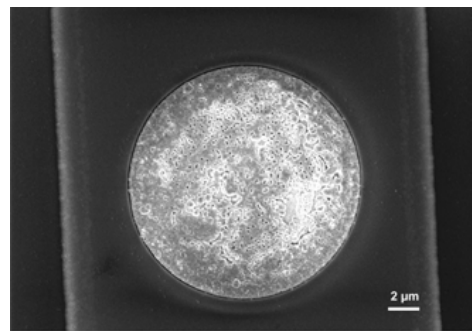
7) Komplette MEA-Prozessierung einschließlich ONO-Schicht am Forschungszentrum caesar, Bonn

In einem zweiten Versuch bei caesar wurde der komplette Prozess zur MEA-Herstellung im dortigen Reinraum durchgeführt. Dabei fanden ausschließlich Trockenätzschritte Verwendung. Positive Ergebnisse zur Haftung verschiedener Passivierungsschichten auf Metallen nach Trockenätzprozessen lagen bei caesar bereits vor. Die einzelnen Schritte zur MEA-Herstellung sind in Kapitel 4.4 beschrieben. Als Passivierung wurde wieder eine ONO-Schicht mit der Abfolge 300 nm / 200 nm / 300 nm verwendet. Zum Schluss wurden

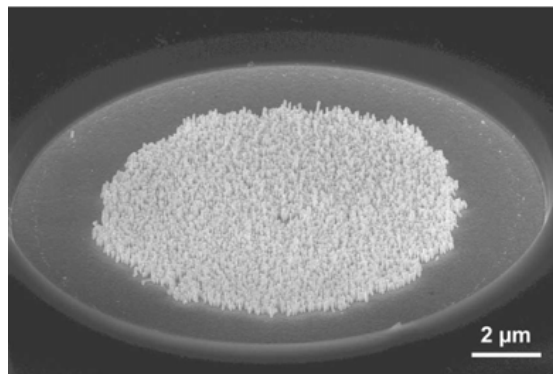
mit dem Elektronenstrahlverdampfer 800 nm Aluminium auf die Wafer aufgebracht. Anodisierung und Porenerweiterung dieser MEA-Chips verliefen problemlos, und unter dem Lichtmikroskop war anschließend eine intakte ONO-Schicht zu sehen. Nach der Galvanisierung wurde das Al_2O_3 in KOH entfernt. Auch nach diesem Schritt war die ONO-Schicht noch intakt, und bereits im Lichtmikroskop waren Abscheidungen auf den Elektroden zu erkennen. Die weitere Untersuchung im REM zeigte unterschiedliche Ergebnisse. Auf einigen Elektrodenfenstern wurde entweder gar kein Gold abgeschieden, oder die Elektroden waren großflächig mit galvanischem Gold bedeckt (s. Abb. 5.40(a) und 5.40(b)). Auf einzelnen MEA-Chips waren in dieser Versuchsreihe aber auch erstmals Gold-Nanopillars in den Elektrodenfenstern zu sehen, wie Abb. 5.40(c) zeigt.



(a) Keine Abscheidung von Gold



(b) Großflächige Goldabscheidung



(c) Gold-Nanopillars auf einer Mikroelektrode,
hergestellt in 800 nm dickem Al-Template

Abbildung 5.40: REM-Aufnahmen von Mikroelektroden, die am Forschungszentrum caesar prozessiert und im IBN-2 nanostrukturiert wurden

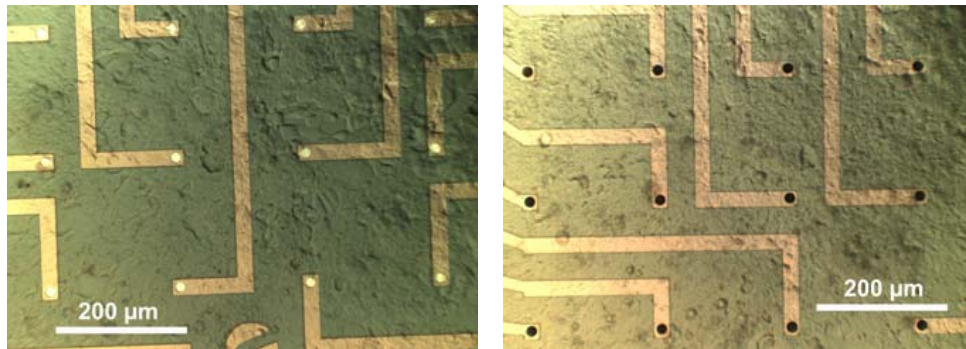
Nach schrittweiser Verlängerung der Anodisierungszeiten konnte der Prozess so weit optimiert werden, dass pro Durchlauf zuverlässig ca. 90 % der MEA-Chips Gold-Nanopillars aufwiesen. Auf diesen Chips waren ca. 95 % aller Elektrodenfenster dicht mit Gold-Nanopillars bewachsen. Lediglich auf Elektroden mit $8\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser wuchsen die Pillars mit geringer Dichte. Auf den einzelnen Elektrodenfenstern befand sich zudem für alle Durchmesser ein Randbereich ohne Nanopillars (s. Abb. 5.40(c)), da an der Kante zur Passivierung hin das Aluminium nicht ausreichend auf den Elektroden haften konnte. Daher konnte der Außenkreis nicht anodisiert werden, weswegen es hier nicht zum Pillarwachstum kam.

5.5 Signableitung mit nanostrukturierten MEAs

Die nanostrukturierten MEAs wurden nun in wiederholten Zellkulturen zur Ableitung extrazellulärer Signale verwendet. In diesen Kopplungsexperimenten wurde untersucht, ob die angestrebte Verbesserung der Signalqualität durch Nanopillars auf den Gold-MEAs erreicht werden konnte.

5.5.1 Ableitung extrazellulärer Signale von elektroaktiven Zellen

Für die vergleichende Ableitung extrazellulärer Signale mit nanostrukturierten und planaren MEAs wurden aufgrund ihrer guten Adhäsionseigenschaften HL1-Kulturen benutzt. Insgesamt wurden 24 planare und 24 nanostrukturierte MEAs mit den Elektrodendurchmessern $8\text{ }\mu\text{m}$, $10\text{ }\mu\text{m}$, $15\text{ }\mu\text{m}$ und $20\text{ }\mu\text{m}$ verwendet. Abb. 5.41(a) zeigt dichtes Wachstum von HL1-Zellen auf planaren Gold-MEAs vom Durchmesser $15\text{ }\mu\text{m}$. In Abb. 5.41(b) ist die lichtmikroskopische Aufnahme einer HL1-Kultur auf nanostrukturierten MEAs zu sehen. Deutlich erkennbar ist in diesem Bild die braune Färbung der Elektroden aufgrund der Gold-Nanopillars. Auf dem planaren Chip erscheinen die Elektrodenbereiche dagegen gelb. Abb. 5.42 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer vitalen und relativ dichten HL1-Kultur auf einem nanostrukturierten MEA-Chip. Auch hier ist zu erkennen, dass auf den Elektrodenbereichen Nanopillars gewachsen sind (s. rote Pfeile).



(a) HL1-Kultur auf planaren MEAs mit $15\ \mu\text{m}$ Durchmesser. Die Elektrodenbereiche sind hier gelb.

(b) HL1-Kultur auf nanostrukturierten MEAs mit $15\ \mu\text{m}$ Durchmesser. Durch die Pillars erscheinen die Elektroden braun.

Abbildung 5.41: HL1-Kulturen an DIV 4 auf planaren und nanostrukturierten Gold-MEAs

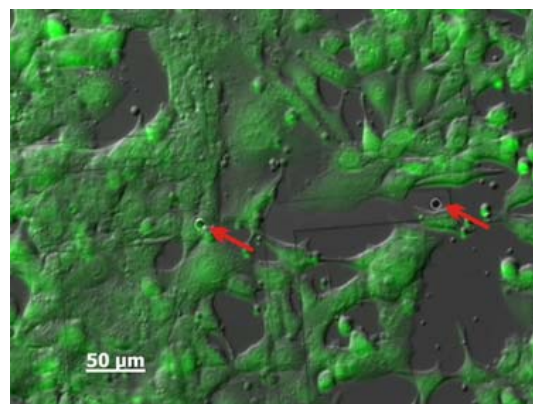
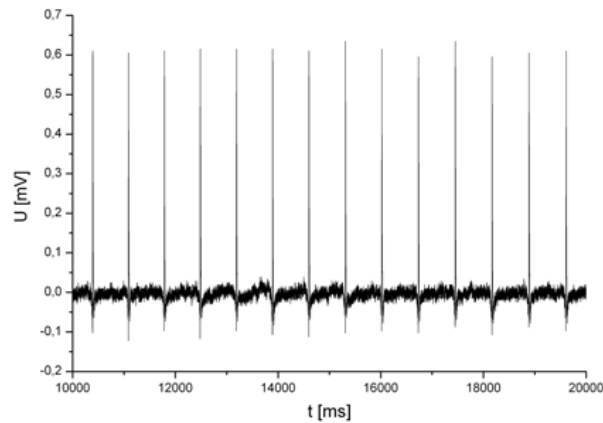
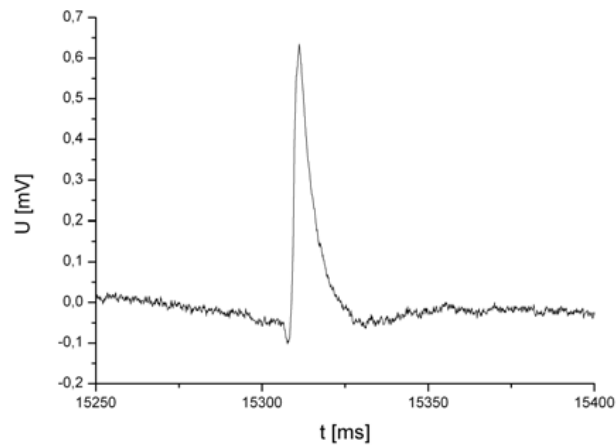


Abbildung 5.42: Live-Dead-Staining einer HL1-Kultur auf nanostrukturierten MEAs

Sowohl mit nanostrukturierten als auch mit planaren MEAs war die reproduzierbare Ableitung von extrazellulären Signalen aus HL1-Kulturen möglich. Abb. 5.43(a) zeigt exemplarisch die regelmäßige Ableitung von Aktionspotenzialen mit nanostrukturierten MEAs vom Durchmesser $15\ \mu\text{m}$. In der zugehörigen vergrößerten Darstellung in Abb. 5.43(b) ist deutlich die charakteristische Form des Aktionspotenzials zu erkennen, wie sie in Kapitel 3.5.1 vorgestellt wurde.



(a) Ableitung von Aktionspotenzialen an HL1-Zellen mit nanostrukturierten MEAs vom Durchmesser $15\ \mu\text{m}$



(b) Einzelnes Aktionspotenzial aus HL1-Kultur, gemessen mit nanostrukturiertem MEA vom Durchmesser $15\ \mu\text{m}$

Abbildung 5.43: Ableitung von Aktionspotenzialen mit nanostrukturierten MEAs

Ausschlaggebend bei der Auswertung der extrazellulären Signale von nanostrukturierten MEAs im Vergleich zu planaren Elektroden war das Verhältnis zwischen der Amplitude des Aktionspotenzials und dem Signalausgang. Zu diesem Zweck wurde zunächst auf je-

dem Chip mit 64 Elektroden die Elektrode ausgewertet, die das Signal mit der höchsten Signalamplitude lieferte. Für diese Elektrode wurde aus allen aufgezeichneten Signalen ein mittleres Aktionspotenzial bestimmt, das in den nachfolgenden Balkendiagrammen mit der zugehörigen Standardabweichung als Fehlerbalken dargestellt ist. Diese gemittelten maximalen Aktionspotenziale pro Chip wurden unter Berücksichtigung der verschiedenen Zellkultur-Experimente für jeden Elektrodendurchmesser getrennt ausgewertet. Insgesamt flossen extrazelluläre Signale aus bis zu vier verschiedenen HL1-Kulturen in die Auswertung ein. In jedem Experiment wurden zwei planare und zwei Pillar-Chips mit HL1-Zellen besiedelt, von deren 64 Elektroden anschließend Aktionspotenziale detektiert wurden. Aufgrund von Variationen in der Zellkultur konnte in einigen Experimenten allerdings nur ein MEA-Chip vom jeweiligen Elektrodentyp ausgewertet werden.

Bei Signalableitungen an MEAs mit $8\mu\text{m}$ Durchmesser wurden zwei Kulturen aus HL1-Zellen verwendet (s. Abb. 5.44). Mit diesem Elektrodentyp wurden relativ niedrige Signalamplituden zwischen 0,1 und 0,6 mV gemessen. Im ersten Experiment war keine deutliche Erhöhung der Signalamplitude durch Nanopillars auf den MEAs zu erkennen, jedoch wurden in der zweiten Kultur an nanostrukturierten MEAs geringfügig höhere Signale gemessen als an der planaren Referenz. Insgesamt wurde mit diesem Elektrodentyp allerdings keine signifikante Verbesserung der Signalqualität erzielt.

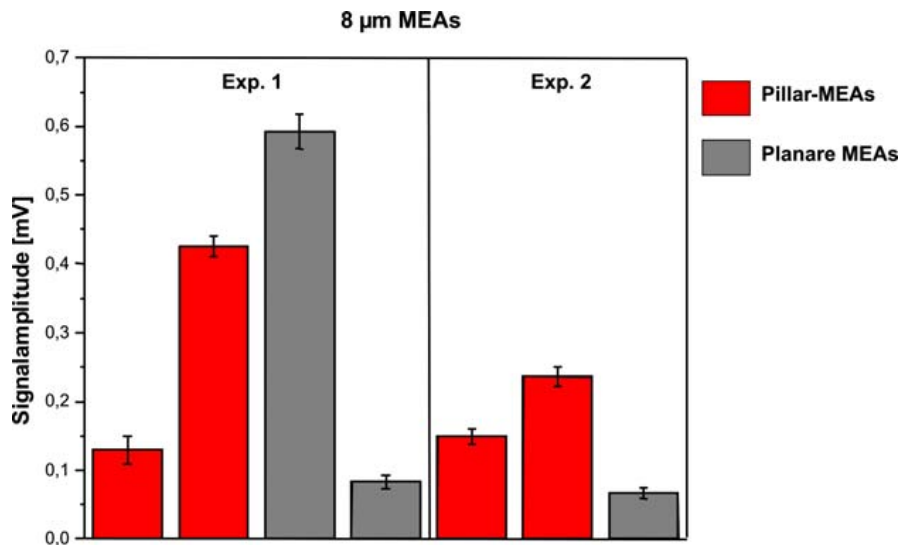


Abbildung 5.44: Gemittelte Signalamplituden für MEAs mit $8\mu\text{m}$ Durchmesser

Wie in Abb. 5.45 dargestellt, wurden für MEAs mit $10\ \mu\text{m}$ Durchmesser die Signale aus vier verschiedenen HL1-Kulturen ausgewertet. Hierbei wurden deutlich höhere Signalamplituden gemessen als bei MEAs mit $8\ \mu\text{m}$ Durchmesser. Die Höhe der Aktionspotenziale variierte stark von $0,1$ bis $1,1\ \text{mV}$. In allen Experimenten mit $10\ \mu\text{m}$ großen MEAs fanden sich für nanostrukturierte Elektroden überwiegend höhere Signalamplituden als für planare Chips, so dass mit diesem Elektrodentyp eine Verbesserung der Signalqualität erzielt wurde.

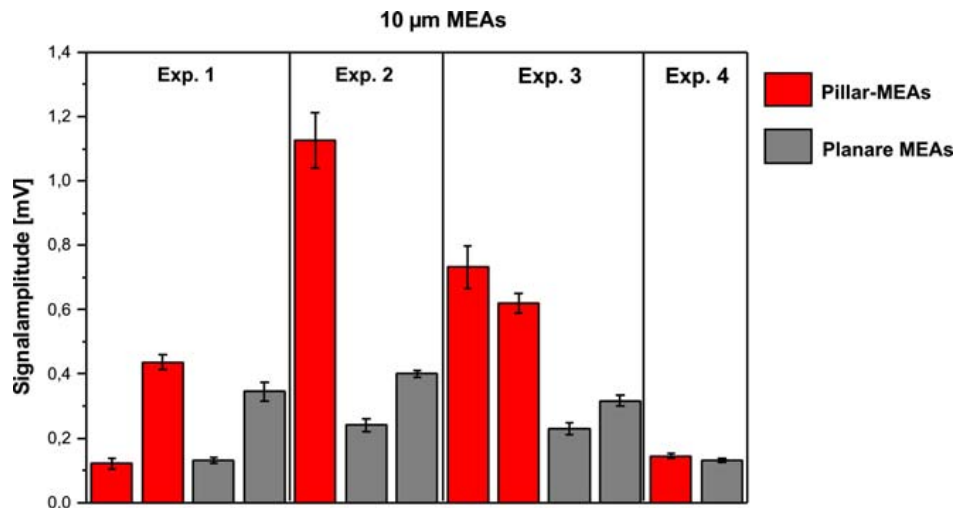


Abbildung 5.45: Gemittelte Signalamplituden für MEAs vom Durchmesser $10\ \mu\text{m}$

Signalableitungen mit $15\ \mu\text{m}$ großen MEAs wurden an drei verschiedenen HL1-Kulturen durchgeführt und sind in Abb. 5.46 im Überblick dargestellt. Auch hier wurden maximale Aktionspotenziale verzeichnet, die nur zwischen $0,1$ und $0,6\ \text{mV}$ lagen. Insgesamt waren einige der Signale, die mit Nanopillar-MEAs gemessen wurden, höher als die Resultate aus den Vergleichsmessungen mit planaren MEAs. Allerdings gab es auch nanostrukturierte Chips, deren Signale niedriger waren als bei planaren MEAs.

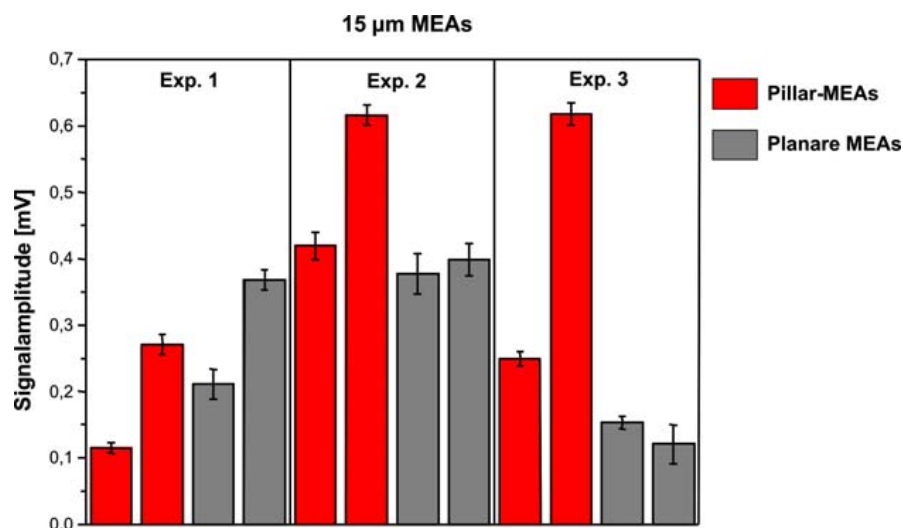


Abbildung 5.46: Gemittelte Signalamplituden für MEAs mit 15 μm Durchmesser

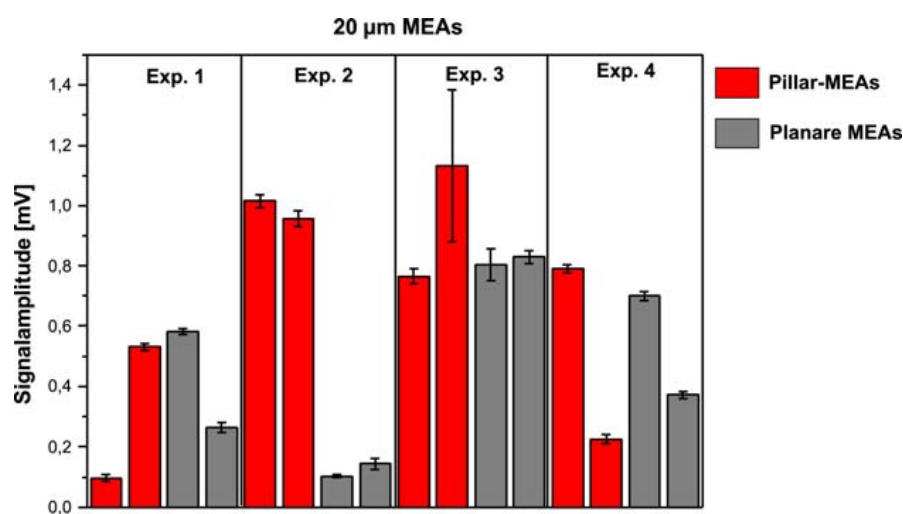


Abbildung 5.47: Gemittelte Signalamplituden für MEAs mit 20 μm Durchmesser

Zuletzt wurden in vier HL1-Kulturen MEAs mit 20 μm Durchmesser zur extrazellulären Ableitung eingesetzt (s. Abb. 5.47). Für diese Elektrodengröße wurden erneut Signalamplituden zwischen 0,1 und 1,1 mV gemessen. Auch bei diesem Typ wurden an nanostruk-

turierten MEAs maximale Aktionspotenziale verzeichnet, die im Vergleich zu planaren Elektroden deutlich erhöht waren (s. Experiment 2). Allerdings gab es in den anderen Experimenten keinen eindeutigen Trend, in dem ein bestimmter MEA-Typ besonders hohe Signalamplituden zeigte.

Abschließend wurden die maximalen Aktionspotenziale für die vier untersuchten Elektrodendurchmesser direkt den Resultaten aus den Vergleichsmessungen an planaren MEAs gegenüber gestellt. Zu diesem Zweck wurden die maximalen Signale aller Zellkulturexperimente für den jeweiligen Elektrodendurchmesser gemittelt und mit einer Standardabweichung angegeben. Aus diesen gemittelten Aktionspotenzialen wurden dann die Vergrößerungsfaktoren pro Elektrodendurchmesser bestimmt. Die Angabe von Fehlern für diese Faktoren war nicht sinnvoll, da hohe Schwankungen zwischen den einzelnen HL1-Kulturen vorlagen und die Stichprobenzahl pro Kultur insgesamt sehr niedrig war. Tabelle 5.12 zeigt diese Ergebnisse im Überblick.

MEA-Typ	Aktionspotenzial [mV]	Vergrößerungsfaktor
8 μm Pillars	$0,24 \pm 0,12$	0,95
8 μm planar	$0,25 \pm 0,24$	
10 μm Pillars	$0,53 \pm 0,35$	2,07
10 μm planar	$0,26 \pm 0,10$	
15 μm Pillars	$0,38 \pm 0,19$	1,40
15 μm planar	$0,27 \pm 0,11$	
20 μm Pillars	$0,69 \pm 0,35$	1,45
20 μm planar	$0,47 \pm 0,27$	

Tabelle 5.12: Vergleich der Signalamplituden von HL1-Zellen auf nanostrukturierten und planaren MEAs

Hierbei fällt der besonders niedrige Vergrößerungsfaktor 0,95 bei 8 μm großen MEAs auf. Mit diesem Elektrodentyp kam es zu keiner Erhöhung der Signalamplituden an HL1-Zellen, sondern demnach lag sogar eine Verschlechterung der Signalqualität vor. Das niedrige Resultat der kleinsten MEAs kann eventuell durch die besonders geringe Elektrodenfläche begründet werden, die bei 8 μm Durchmesser für die Zellkopplung zur Verfügung steht. Zwar ist bei allen Elektrodengrößen nie die gesamte Grundfläche mit Pillars bewachsen, da sich am äußeren Rand immer ein prozessbedingter planarer Bereich befindet, jedoch waren auf 8 μm großen MEAs nur 20 bis 30% der Elektrodenfläche mit Pillars

bewachsen. Zudem war die Pillardichte auf allen $8\text{ }\mu\text{m}$ großen Elektroden wesentlich geringer als auf den anderen Elektroden. Dadurch kam die angestrebte Vergrößerung der Elektrodenfläche durch die Nanostrukturen bei diesem Typ nicht zum Tragen.

Unerwartet hoch war der Vergrößerungsfaktor hingegen bei MEAs mit $10\text{ }\mu\text{m}$, wo er 2,07 betrug. MEAs mit $15\text{ }\mu\text{m}$ und $20\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser führten ebenfalls zu erhöhten Signalamplituden von nanostrukturierten MEAs gegenüber planaren Chips. Für $15\text{ }\mu\text{m}$ wurde ein Vergrößerungsfaktor von 1,40 ermittelt, bei $20\text{ }\mu\text{m}$ betrug er 1,45. Dadurch konnten mit nanostrukturierten MEAs vom Durchmesser $10\text{ }\mu\text{m}$ die höchsten Aktionspotenziale gemessen werden, gefolgt von $20\text{ }\mu\text{m}$ und $15\text{ }\mu\text{m}$ großen Elektroden.

Im Anschluss an die Auswertung der maximalen Signalthöhen pro MEA-Chip wurde das Signal-Rausch-Verhältnis (SRV) analysiert. Das Effektiv-Rauschen (d.h. das rms-Rauschen, *root mean square*) für die jeweiligen Elektroden wurde aus den Zeitintervallen zwischen 300 und 200 ms vor den entsprechenden Aktionspotenzialen ermittelt.

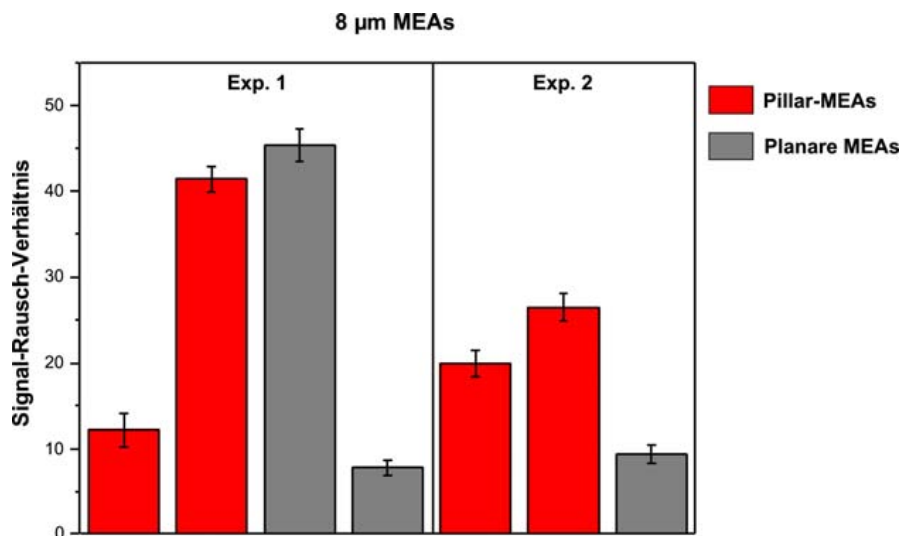


Abbildung 5.48: Signal-Rausch-Verhältnis für MEAs mit $8\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser

Das SRV von $8\text{ }\mu\text{m}$ großen MEAs ist in Abb. 5.48 dargestellt. Die Werte liegen zwischen 10 und 45 und sind damit sehr niedrig. Dennoch ist aufgrund dieser Daten in allen Experimenten eine leichte Erhöhung des SRVs für Pillar-MEAs gegenüber planaren Chips

zu erkennen. Dieser Trend steht im Gegensatz zur vorherigen Auswertung der Signalamplituden, bei der nanostrukturierte MEAs sogar niedrigere Signale lieferten als planare Chips.

Die Auswertung des SRVs der $10\text{ }\mu\text{m}$ großen MEAs ist in Abb. 5.49 dargestellt und ergab Werte zwischen 5 und 120. Wie auch bereits bei den Aktionspotenzialen wurde damit eine deutliche Verbesserung der Signalqualität in allen Experimenten nachgewiesen. Auffallend hoch war das SRV in Experiment 2, wo ein Wert von 120 erreicht wurde. Dennoch gab es auch für diesen Elektrodentyp in Experiment 1 einen nanostrukturierten Chip mit geringerem SRV als bei vergleichbaren planaren MEAs.

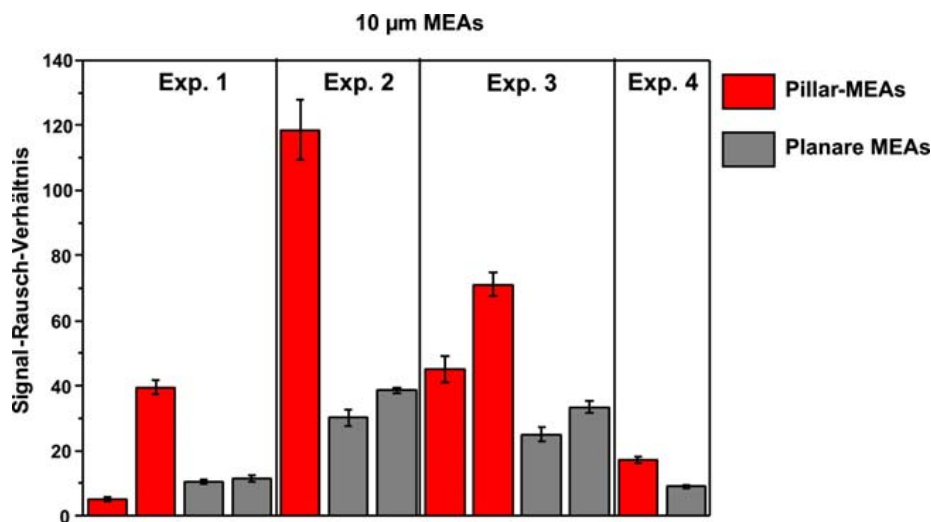


Abbildung 5.49: Signal-Rausch-Verhältnis für $10\text{ }\mu\text{m}$ große MEAs

Für MEAs mit $15\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser wurden SRVs zwischen 10 und 65 ermittelt, wie Abb. 5.50 zeigt. In Experiment 2 und 3 wurden mit nanostrukturierten Elektroden die höchsten SRVs erzielt, die über den zugehörigen Werten von planaren MEAs lagen. Nur in Experiment 1 war dieser Trend nicht zu beobachten, so dass für $15\text{ }\mu\text{m}$ große MEAs aufgrund der vorliegenden Daten ebenfalls von einer Erhöhung des SRVs ausgegangen werden kann. Diese Signalverbesserung ist allerdings geringer ausgeprägt als bei den MEAs mit $10\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser.

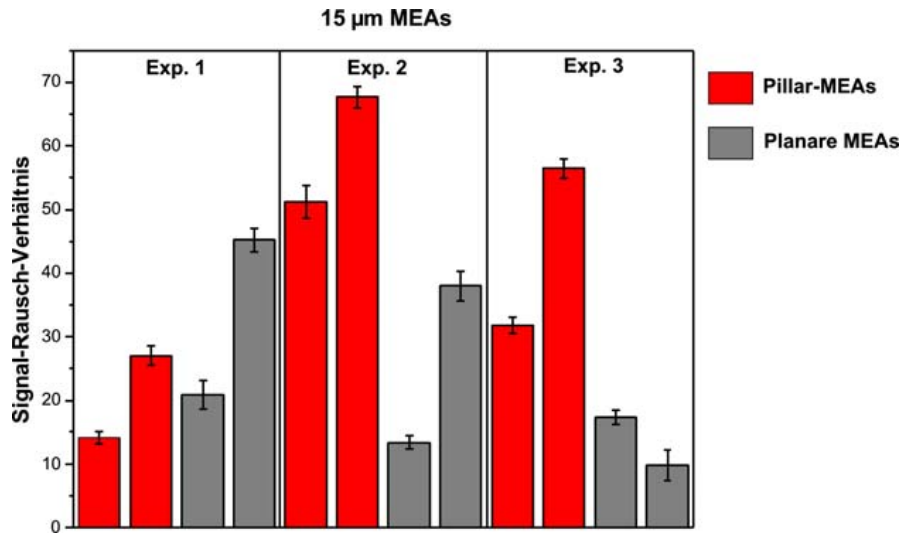


Abbildung 5.50: Signal-Rausch-Verhältnis für MEAs vom Durchmesser 15 µm

Wie Abb. 5.51 zeigt, konnten mit 20 µm großen Elektroden SRVs zwischen 10 und 140 erzielt werden. In Experiment 2 lag ein auffallend hoher Unterschied zwischen nanostrukturierten und planaren MEAs vor. Allerdings war in den Experimenten 1, 3 und 4 keine Erhöhung des SRVs zu beobachten. Insgesamt wurde die angestrebte Verbesserung der Signalqualität mit diesem Elektrodentyp nur vereinzelt erreicht, denn im Mittel der vier Zellkulturexperimente konnte keine signifikante Erhöhung des SRVs nachgewiesen werden.

Die quantitative Auswertung der SRVs für unterschiedliche Elektroden ist in Tabelle 5.13 zusammengefasst. Wiederum wurde auf die Angabe von Fehlern für die Vergrößerungsfaktoren verzichtet. Die angestrebte Verbesserung der Signalqualität ist mit einer Erhöhung des SRVs um den Faktor 2,2 bei 10 µm am stärksten ausgeprägt. Für MEAs mit 15 µm Durchmesser war das SRV durchschnittlich um den Faktor 1,7 erhöht. Bei MEAs mit den Durchmessern 8 und 20 µm lag der Vergrößerungsfaktor hingegen nur bei 1,2 bzw. 1,3. Damit konnte bei diesen beiden Elektrodendurchmessern kaum eine effektive Verbesserung des SRVs nachgewiesen werden. Bis auf einen Unterschied bei den 8 µm großen MEAs folgte die Auswertung des SRVs damit im wesentlichen den vorherigen Ergebnissen der Aktionspotenziale.

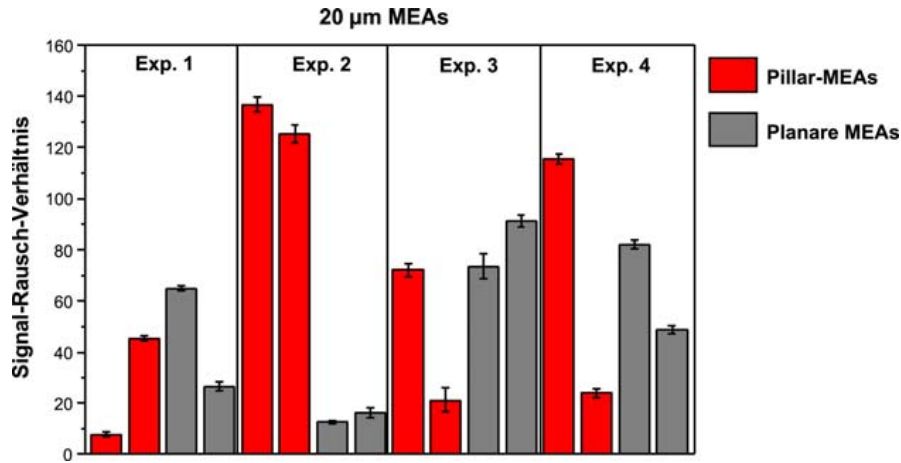


Abbildung 5.51: Signal-Rausch-Verhältnis für MEAs mit 20 µm Durchmesser

MEA-Typ	Signal-Rausch-Verhältnis	Vergrößerungsfaktor
8 µm Pillars	25 ± 11	1,2
8 µm planar	21 ± 17	
10 µm Pillars	49 ± 37	2,2
10 µm planar	23 ± 11	
15 µm Pillars	41 ± 19	1,7
15 µm planar	24 ± 13	
20 µm Pillars	69 ± 48	1,3
20 µm planar	52 ± 29	

Tabelle 5.13: Vergleich des Signal-Rausch-Verhältnisses von nanostrukturierten und planaren MEAs

Um den Einfluss der mehrfachen Verwendung von nanostrukturierten MEAs zu untersuchen, wurden MEA-Chips nach der Kultivierung von HL1-Zellen gereinigt. Zunächst wurden die Chips mit 70% Ethanol und destilliertem Wasser gespült. Es folgte das Ablösen der Zellreste und der Fibronectin-Beschichtung mit dem Enzym Trypsin bei 37°C für 15 bis 20 Min. Anschließend wurden die Chips 1,5 h lang in einer 2%igen Lösung des Tensids Hellmanex (Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim) gereinigt. Die Tensidreste wurden schließlich durch mehrstündiges Waschen in einer Durchflusszelle mit ultrareinem Wasser

von den Chips entfernt. Das Ergebnis dieser Reinigungsprozedur zeigt Abb. 5.52. An den Stellen, wo die Pillars weniger dicht gewachsen waren, sind deutlich umgeknickte Nanostrukturen zu erkennen, die eindeutig auf die Chip-Reinigung zurückzuführen sind. Damit ist die mehrfache Nutzung von Gold-Nanopillar-MEAs nur eingeschränkt möglich.

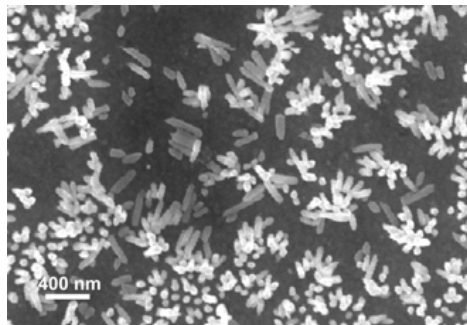


Abbildung 5.52: Umgeknickte Nanopillars auf einer mehrfach verwendeten Elektrode

5.5.2 Elektrochemische Charakterisierung von nanostrukturierten und planaren MEAs

Um genaueren Aufschluss über die beobachteten Verhältnisse der Elektrodenantworten zu erhalten, wurden die MEA-Chips im Anschluss an die Ableitung extrazellulärer Signale elektrochemisch untersucht. Dabei wurden dieselben nanostrukturierten und planaren MEA-Chips zur Aufnahme von Impedanzspektren verwendet. Auf jedem Chip wurde dann die Elektrode untersucht, an der zuvor die höchsten Aktionspotenziale gemessen wurden. Die Frequenz wurde von 1 Hz bis 10^4 Hz variiert, und als Elektrolyt kam 1x PBS zum Einsatz. Um die Impedanzspektren zu fitten und daraus die Kapazitäten zu bestimmen, wurde das Ersatzschaltbild in Abb. 5.53 verwendet.

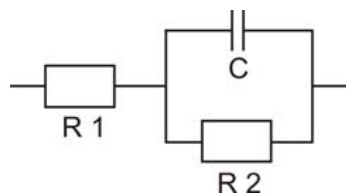


Abbildung 5.53: Ersatzschaltbild zur Auswertung der Impedanzmessungen an MEAs

Wie Abb. 5.54 zeigt, wurden an nanostrukturierten MEAs mit $8\,\mu\text{m}$ Durchmesser Kapazitäten zwischen 45 und 60 pF gemessen. Die planaren $8\,\mu\text{m}$ großen MEAs lieferten ähnlich große Kapazitäten zwischen 35 und 50 pF. Für diesen Elektrodentyp war damit keine Erhöhung der Kapazität durch Nanopillars ersichtlich.

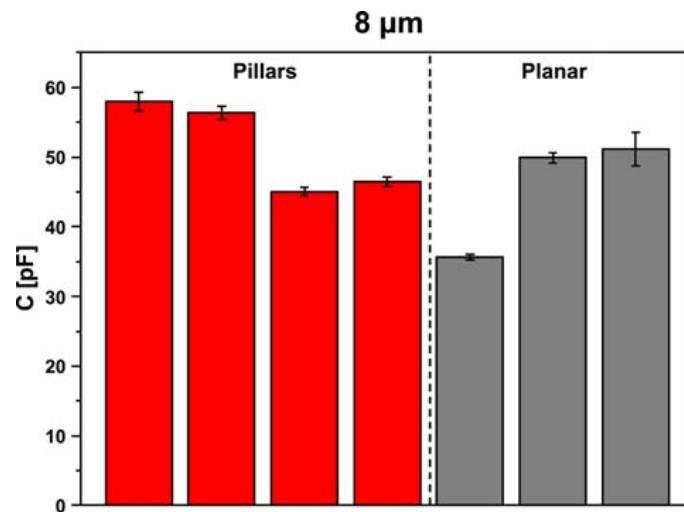


Abbildung 5.54: Auswertung der Impedanzspektren an MEAs mit $8\,\mu\text{m}$ Durchmesser

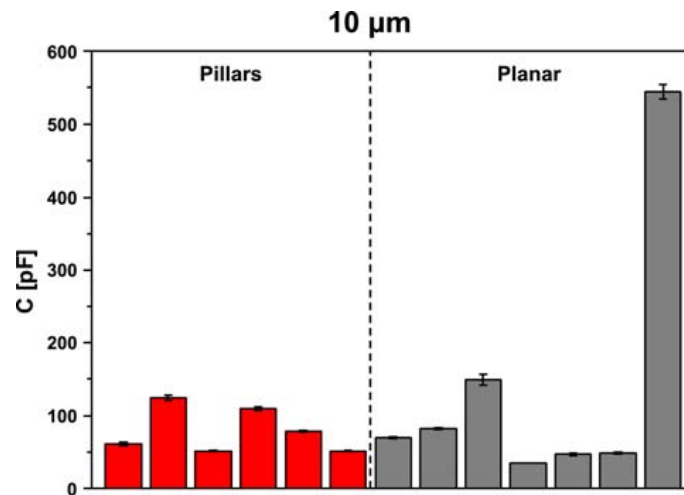


Abbildung 5.55: Auswertung der Impedanzspektren an MEAs mit $10\,\mu\text{m}$ Durchmesser

Abb. 5.55 zeigt die Auswertung der Impedanzspektren für $10\text{ }\mu\text{m}$ große MEAs. Sowohl für planare als auch für nanostrukturierte MEAs schwankten die ermittelten Kapazitäten zwischen 40 und 150 pF, so dass keine sichtbare Abhängigkeit der Kapazität vom Elektrodentyp verzeichnet wurde. Bei einer planaren Elektrode wurden sogar 550 pF gemessen. Allerdings ist dieser hohe Wert mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine undichte Passivierung auf diesem Chip zurückzuführen. Vermutlich bestand über Pinholes in der ONO-Schicht eine Verbindung zu den darunter liegenden Leiterbahnen, die den Anstieg der Kapazität erklärt.

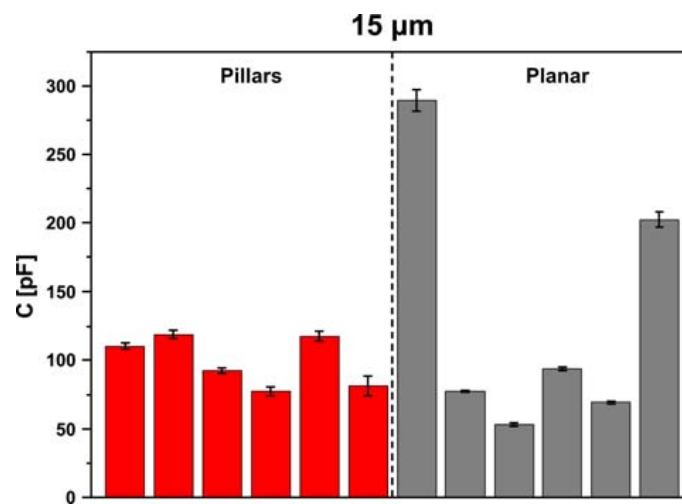


Abbildung 5.56: Auswertung der Impedanzspektren an MEAs mit $15\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser

Für MEAs vom Durchmesser $15\text{ }\mu\text{m}$ bot sich ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Kapazität und Elektrodentyp (s. Abb. 5.56). Im Mittel lagen die Kapazitäten für Nanopillar- und planare MEAs zwischen 50 und 120 pF. Auch hier konnte kein deutlicher Einfluss der Nanopillars auf die Kapazität ermittelt werden. Erneut wiesen zwei der planaren Chips besonders hohe Kapazitäten von 200 und 280 pF auf, deren Auftreten vermutlich wieder mit Pinholes in der Passivierung begründet werden kann.

Besonders stark geschädigt war die Passivierung auf MEAs mit $20\text{ }\mu\text{m}$ großen Elektroden. Wie Abb. 5.57 zeigt, fanden sich hier vor allem für die nanostrukturierten Elektroden Kapazitäten oberhalb von 200 pF, die auf eine undichte Passivierung hindeuten. Auch ein planarer Chip wies mit 430 pF eine extrem hohe Kapazität auf. Aufgrund der hohen

Anzahl von nanostrukturierten Chips mit Pinholes in der Passivierung war für diesen Elektrodendurchmesser kein Vergleich zu den Kapazitäten der planaren MEAs möglich.

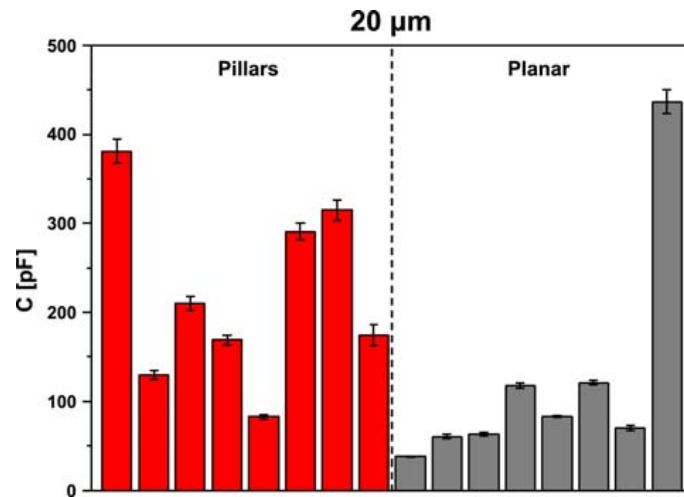


Abbildung 5.57: Auswertung der Impedanzspektren an MEAs mit 20 µm Durchmesser

Werden alle Chips mit undichter Passivierung nicht in der Auswertung der Impedanzspektren berücksichtigt, dann ist für die verschiedenen MEAs keine signifikante Erhöhung der Kapazität durch Gold-Nanopillars zu verzeichnen. Sowohl für nanostrukturierte als auch für planare MEAs liegen die Kapazitäten der Elektroden meist zwischen 50 und 120 pF. Allerdings ergibt sich rechnerisch für die Leiterbahnen auf den Chips unter der verwendeten 800 nm dicken ONO-Schicht bereits eine Kapazität von ca. 36 pF. Gegenüber dem Anteil der Leiterbahnen fallen die gemessenen Kapazitäten der Elektroden damit in einen Bereich, in dem der Effekt der Nanostrukturen nicht deutlich messbar ist. Verschlechtert wurde dieser Umstand in den obigen Messungen dann noch durch die eingeschränkte Haltbarkeit der ONO-Passivierungen. Um den angestrebten Effekt der Kapazitätsvergrößerung von MEAs durch Gold-Nanopillars besser messen zu können, ist daher eine Änderung des Chipdesigns zwingend erforderlich. Beim neuen Elektrodenlayout sollten die Leiterbahnen sowohl verkürzt als auch schmaler gestaltet werden.

Die impedanzspektroskopischen Untersuchungen an MEAs und Signalleitungen an HL1-Zellen wurden im folgenden Teil durch die Messung der Transfercharakteristika ergänzt. Hierfür wurden wieder die Elektroden vermessen, die bereits in der Impedanzspektroskopie untersucht worden waren. In Abb. 5.58 sind exemplarisch typische Transfercharakteristika

für planare und nanostrukturierte MEAs zu sehen. Von den insgesamt 48 Chips zeigten allerdings nur 9 Proben ein Resultat mit diesem typischen Verlauf der Elektrodenantwort. Auf den übrigen Chips sind die untersuchten Elektroden wahrscheinlich durch die vorherige Reinigung zerstört worden, so dass an ihnen keine Transfercharakteristika mehr gemessen werden konnten.

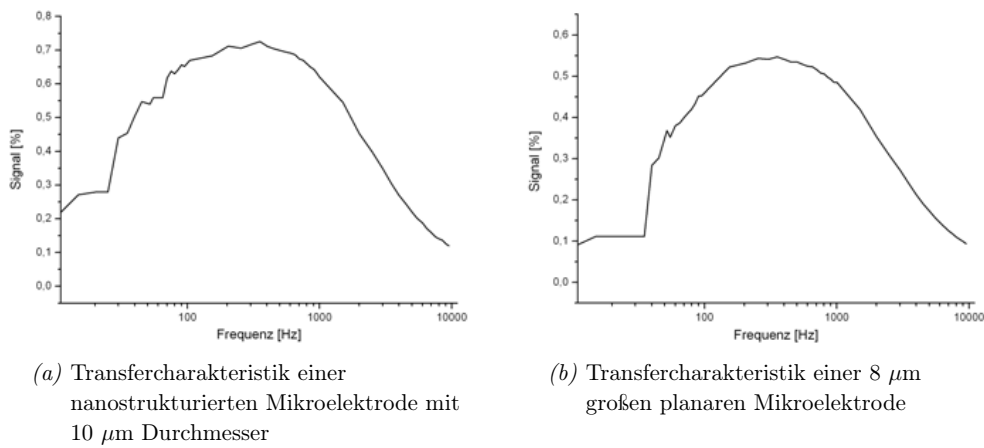


Abbildung 5.58: Exemplarische Transfercharakteristika verschiedener Mikroelektroden

Aus den neun auswertbaren Datensätzen der Lock-In-Messungen wurden nun exemplarisch Z_{leak} und Z_{el} bei 100 Hz von zwei nanostrukturierten und zwei planaren MEAs mit 10 μm Durchmesser bestimmt. Hierfür wurden die Gleichungen 4.4 und 4.5 verwendet. Die vorherigen Signalableitungen mit 10 μm großen MEAs hatten zu stark schwankenden Resultaten für die Aktionspotenziale geführt (s. Abb. 5.45). Die Auswertung der vier Chips ist in Tabelle 5.14 zusammengefasst.

Probe	Aktionspotenzial [mV]	$Z_{leak}[M\Omega]$	$Z_{el}[M\Omega]$
Pillar-1	$1,12 \pm 0,09$	60,0	13,2
Pillar-2	$0,44 \pm 0,02$	81,2	40,0
Planar-1	$0,40 \pm 0,01$	50,1	178,0
Planar-2	$0,23 \pm 0,02$	36,7	193,0

Tabelle 5.14: Auswertung von Transfermessungen und Impedanzspektren für planare und nanostrukturierte MEAs mit 10 μm Durchmesser

Für die Pillar-Proben 1 und 2 unterschieden sich die Signalamplituden ca. um den Faktor 2,5. Die zugehörige Elektrodenimpedanz war für Probe Pillar-2 dreifach höher als für Probe Pillar-1. Dieses Verhältnis der beiden Z_{el} entsprach in etwa der Relation zwischen den Amplituden der beiden Pillar-Proben. Die anschließende Berechnung der Impedanzen Z_{leak} zeigte, dass die Passivierungsimpedanzen dieser beiden Chips ähnlich groß waren. Bei Probe Pillar-1 war Z_{leak} um den Faktor 4,5 höher als Z_{el} . Bei Probe Pillar-2 war Z_{leak} dagegen nur doppelt so groß wie Z_{el} . Da die Passivierungsimpedanzen ähnlich hoch waren, konnte jedoch ein Einfluss der Passivierung auf die Signalamplituden für diese beiden Pillar-MEAs weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Aktionspotenziale der beiden planaren Proben lagen in der Größenordnung der nanostrukturierten Probe Pillar-2. Die Bestimmung von Z_{el} führte jedoch bei beiden planaren Chips zu wesentlich höheren Werten der Elektrodenimpedanz als bei dieser Pillar-Referenz. Demzufolge hätten in der Signalableitung wesentlich niedrigere Amplituden für beide planaren MEAs verzeichnet werden müssen, was nicht der Fall war. Die Berechnung von Z_{leak} der zwei planaren Proben ergab Werte, die ca. um den Faktor 2 niedriger waren als bei der korrespondierenden Pillar-Probe Nr. 2. Zwar scheint die Passivierung der beiden planaren Chips weniger dicht gewesen zu sein als die Isolierung der Probe Pillar-2, allerdings wurden die Signalamplituden hiervon nicht beeinflusst. Gleichzeitig waren die Werte für Z_{el} bei den planaren Chips um den Faktor 3 bis 5 höher als die Passivierungsimpedanzen Z_{leak} . Auch diese Relation deutet auf undichte Passivierungen auf diesen Chips hin.

6 Diskussion

6.1 Geometrische und elektrochemische Analyse von Gold-Nanopillars

Geometrische Analyse von Gold-Nanopillar-Elektroden mittels REM

In der vorliegenden Arbeit wurde die Herstellung von Gold-Nanopillars mit reproduzierbaren Geometrien durch die Anodisierung von Aluminiumoxid realisiert. Durchmesser und Abstand der dabei entstandenen Nanoporen ließen sich über die Anodisierungsspannung, den pH-Wert der Säure sowie die Temperatur des Ätzbades verlässlich steuern. Der Durchmesser wurde zudem durch die anschließende Porenerweiterung in H_3PO_4 kontrolliert, und die Höhe der Pillars ließ sich über die Dauer des folgenden Galvanisierungsprozesses einstellen. In der REM-Untersuchung der Gold-Nanostrukturen zeigte sich, dass mit ca. 180 nm hohen Nanopillars vom Durchmesser 60 nm eine geometrische Vergrößerung der mit Pillars bewachsenen Grundfläche A_0 um einen Faktor $9,8 \pm 1,3$ möglich war. Mit der Herstellung noch höherer Nanopillars kann dieser Wert in Zukunft weiter vergrößert werden. Allerdings kann es bei extrem hohen Aspektverhältnissen der Pillars zu Instabilitäten kommen, wenn die Pillardichte gering ist. Vor allem bei hohen Nanopillars sollten daher während der verschiedenen Reinigungsschritte mechanische Belastungen vermieden werden, damit sie nicht umknicken oder sich ablösen.

Kapazitätsbasierte Zyklovoltametrie an Gold-Nanopillar-Elektroden

Für Zyklovoltametrie in 0,15 M NaCl wurden die Doppelschichtkapazitäten von Gold-Nanopillars und planarem Gold für zwei Scangeschwindigkeiten miteinander verglichen. Aus den Verhältnissen der Kapazitäten wurde anschließend die Oberflächenvergrößerung (OV) durch Nanopillars gegenüber der Grundfläche der planaren Substrate ermittelt und mit der OV aus der REM-Analyse verglichen. Als Grundfläche A_{ges} wurde hierbei die Flä-

che $0,35\text{ cm}^2$ der planaren Goldreferenzen zugrunde gelegt. So ergab sich aus der REM-Analyse gegenüber der elektrochemisch relevanten Grundfläche A_{ges} eine geometrische OV von $7,4 \pm 0,8$. Bei der Zyklovoltametrie in NaCl betrug die OV dagegen nur $3,7 \pm 1,0$ und war zudem mit vergleichsweise hohen, experimentell bedingten Schwankungen behaftet. Dieser Vergrößerungsfaktor wich deutlich von der geometrisch bestimmten Flächenvergrößerung ab und deutet darauf hin, dass an der Reaktion im Elektrolyten nicht die gesamte Pillar-Oberfläche beteiligt war.

Auffallend war bei der Zyklovoltametrie in NaCl außerdem, dass die gemessenen Kapazitäten sowohl für planare als auch für Pillar-Proben stark von der jeweiligen Scangeschwindigkeit abhingen. Man könnte annehmen, dass diese Abhängigkeit auf die Adsorption von Chlorid-Ionen an der Pillaroberfläche zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurden zusätzliche zykvoltametrische Untersuchungen von Gold-Nanopillars in $0,15\text{ M KNO}_3$ durchgeführt [96]. Allerdings traten in den Messungen mit Nitrat ähnliche Effekte auf. Daher scheidet die Chlorid-Adsorption als Grund für die Abhängigkeit der Doppelschichtkapazität von der Scangeschwindigkeit aus. Ein anderer Erklärungsansatz beruht auf der Annahme, dass sich zwischen den Pillars noch Reste der Chemikalien befanden, die im Herstellungsprozess verwendet wurden. Diese eventuelle Kontamination mit Säuren, Laugen oder Cyanid könnte ebenfalls Einfluss auf die Doppelschichtkapazität genommen haben, die zykvoltametrisch ermittelt wurde. Zudem wurden bei der Zyklovoltametrie relativ hohe Potenzialdifferenzen bis zu 1 V durchlaufen, die eine Veränderung der Pillaroberfläche durch eventuell vorhandene Kontaminationen hervorgerufen haben könnten.

Die auffallend niedrige Kapazität, die hier mittels Zyklovoltametrie an Gold-Nanopillar-Elektroden beobachtet wurde, steht den Untersuchungen von Anandan, Forrer und Yang gegenüber [36, 65, 66] (s. Kapitel 3.4.3). Forrer fand mittels Zyklovoltametrie für Nanostrukturen mit 30 bis 80 nm Durchmesser und Längen zwischen 100 und 800 nm extrem hohe Kapazitäten und daraus resultierende Oberflächenvergrößerungen von 90 . Bei Yang wurde dagegen mit $2\text{ }\mu\text{m}$ hohen Pt-Nanowires vom Durchmesser 250 nm nur eine sechsfache Vergrößerung der Oberfläche mittels Zyklovoltametrie nachgewiesen, die den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit mit Gold-Nanopillars am nächsten kommt. Anandan untersuchte Nanostrukturen, die bis zu $4,5\text{ }\mu\text{m}$ hoch waren und einen Durchmesser von 100 nm hatten und ermittelte hierfür eine Oberflächenvergrößerung von 38 . Der zykvoltametrisch ermittelten Vergrößerung stand bei Anandan ein Faktor 12 gegenüber, der mittels REM bestimmt wurde. Unter Berücksichtigung der abweichenden Nanostruktur-Geometrien in den jeweiligen Studien scheinen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit einer geometrischen Vergrößerung von $7,4 \pm 0,8$ die Ergebnisse der REM-Analyse von Anandan

zu bestätigen. Das REM liefert scheinbar verlässlichere Resultate für die Oberflächenvergrößerung als die Kapazitätsbestimmung mittels Zyklovoltametrie, wie auch Anandan in seiner Veröffentlichung darlegt. Die Abweichung zwischen den beiden Methoden kann damit begründet werden, dass der Ladestrom in der Doppelschicht scheinbar kein geeigneter Parameter zur Bestimmung der elektroaktiven Oberfläche ist. Daher ist auch der Trend zu extrem hohen Oberflächenvergrößerungen für die Nanostrukturen aus Forrers Arbeit nicht realistisch. Vor allem das Fehlen ergänzender Methoden zur Bestimmung der Vergrößerung in dieser Studie lässt den hohen Wert von 90 fraglich erscheinen. In einem realistischen Bereich liegt dagegen die sechsfache Oberflächenvergrößerung aus Yangs Studie, in der die Nanostrukturen allerdings wesentlich breiter und höher waren als die hier untersuchten Gold-Nanopillars.

Diffusionskontrollierte Zyklovoltametrie an Gold-Nanopillar-Elektroden

Im diffusionskontrollierten System mit 1 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ in 1 M KCl wurde aus den Peakströmen von zwei Scangeschwindigkeiten eine Oberflächenvergrößerung in Höhe von $1,08 \pm 0,03$ ermittelt. Bei einem rein elektrochemischen Strom wäre dieser proportional zur verwendeten Goldoberfläche, und es müsste sich ein höherer Vergrößerungsfaktor ergeben. Allerdings waren die Peakströme mit Hexacyanoferrat für planares Gold und für Gold-Nanopillars gleich hoch und daher unabhängig von der Oberfläche der untersuchten Struktur. Hiermit war der Gesamtumsatz der redoxaktiven Substanz im Elektrolyten für Gold-Nanopillars und planares Gold gleich hoch, was indiziert, dass die Ströme in diesem System diffusionslimitiert waren. Bezogen auf die spezifische Oberfläche war die Reaktion an den Pillaroberflächen jedoch vermindert, da offenbar nicht alle Regionen der Pillars gleichermaßen an der elektrochemischen Reaktion beteiligt waren. Vermutlich trat für die Gold-Nanopillar-Elektroden der von Forrer dargestellte Fall von eindimensionaler Diffusion auf, wie er in Abb. 3.19(c) gezeigt ist [65]. Damit wären hauptsächlich die oberen Partien der Nanopillars an der Reaktion beteiligt gewesen. Außerdem kann es zwischen den Nanopillars relativ schnell zu einer diffusionsbedingten Verarmung der redoxaktiven Substanz im Elektrolyten gekommen sein. Bei der Untersuchung von elf verschiedenen Scangeschwindigkeiten zwischen $5 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$ und $10000 \frac{\text{mV}}{\text{s}}$ in $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ konnte überdies nachgewiesen werden, dass sich die Abhängigkeit der Peakströme von der Scangeschwindigkeit mit einer Wurzelfunktion fitten lässt. Diese Beobachtung deckte sich mit den Untersuchungen von Anandan und belegt ebenfalls die erwarteten eindimensionalen Diffusionsmechanismen an Gold-Nanopillar-Elektroden [66]. Für niedrige Scangeschwindigkeiten stimmen die Abhängigkeiten der Peakströme für Pillars und planares Gold überein. Laufen die Reaktionen schneller ab, werden für Gold-Nanopillars zunehmend größere Peakströme

verzeichnet als an den planaren Substraten. Dieser Trend deutet darauf hin, dass es für höhere Geschwindigkeiten an den Pillars zu einem Übergang vom eindimensionalen Diffusionsverhalten zu nichtlinearer, zylindrischer Diffusion kommt. Diese Zeitabhängigkeit folgte wie erwartet der Cottrell-Gleichung 3.23 für diffusionsabhängige Systeme.

Impedanzspektroskopie an Gold-Nanopillar-Elektroden

Aus den anschließenden impedanzspektroskopischen Messungen in 0,15 M NaCl zwischen 1 Hz und 10^4 Hz ergab sich für Gold-Nanopillars eine durchschnittliche Oberflächenvergrößerung von $8,4 \pm 1,2$. Diese Vergrößerung ist im Vergleich zum Faktor aus den Zyklovoltametrie-Daten in NaCl ($3,7 \pm 1,0$) mehr als doppelt so hoch. Außerdem war der impedanzspektroskopische Wert etwas höher als die zuvor bestimmte geometrische Vergrößerung von $7,4 \pm 0,8$, lag aber grob im Bereich dieser bislang verlässlichsten Methode zur Bestimmung der Kapazität und der daraus resultierenden Oberflächenvergrößerung. Während bei den zyklovoltametrischen Untersuchungen eine starke Abhängigkeit der ermittelten Kapazitäten von den Scangeschwindigkeiten im System beobachtet wurde, ließen sich die Ergebnisse der Impedanzspektroskopie in NaCl mehrfach reproduzieren. Bei dieser Methode war das Elektrolytsystem im Gegensatz zur Zyklovoltametrie keinen großen Potenzialänderungen ausgesetzt, die die Oberfläche der Pillars und ihre elektrochemische Antwort verändert haben könnten. Alle Impedanzspektren wurden für eine kleine Offset-Spannung von 10 mV aufgenommen. Zudem beinhalten die Impedanzspektren gleichzeitig die Frequenzabhängigkeit der Kapazität, deren Kenntnis für die folgenden Signalableitungen von elektroaktiven Zellen besonders wichtig ist. Aus diesen Gründen scheint die Untersuchung von Gold-Nanopillar-Elektroden mittels Impedanzspektroskopie realistischere Resultate zu liefern als die Zyklovoltametrie. Bei beiden Methoden diene die dimensionslose Oberflächenvergrößerung als Indikator, um die Eignung der jeweiligen Elektrolytsysteme für die Untersuchung der elektrochemischen Eigenschaften von Gold-Nanostrukturen zu beurteilen. Allerdings sollte die Oberflächenvergrößerung in künftigen elektrochemischen Studien aufgrund der starken ermittelten Variationen nicht als alleiniger entscheidender Parameter verwendet werden.

6.2 Zellwachstum auf Gold-Nanopillar-Oberflächen

Nach der strukturellen und elektrochemischen Analyse von Gold-Nanopillars folgten Zellkulturexperimente, in denen die Zelllinien HL1 und HEK sowie primäre kortikale Ratten-

neuronen auf ihre Kopplungseigenschaften an die Nanostrukturen hin untersucht wurden. Bislang lagen noch keine Untersuchungen zur Kopplung von Zellen an biokompatible Gold-Nanopillars vor, so dass die vorliegende Arbeit einen ersten Beitrag hierzu liefert.

Für die Zelllinien wurden verschiedene Proteinbeschichtungen verwendet, und bei Neuronen kamen sowohl Proteine als auch Self-Assembled Monolayers zum Einsatz. Im Fokus der Zellversuche standen Vitalität und Adhäsion der unterschiedlichen Zelltypen, die mittels Fluoreszenzmikroskopie, Rasterelektronenmikroskopie und fokussiertem Ionenstrahl analysiert wurden. Es wurde beobachtet, dass Zelllinien wie HL1 und HEK gleichermaßen gut auf planaren und nanostrukturierten Substraten wuchsen. REM-Aufnahmen und FIB-Schnitte belegten außerdem, dass die Adhäsion von HL1- und HEK-Zellen auf Nanopillars ebenso stark war wie auf planarem Gold. Beim Wachstum von Rattenneuronen wurden auf Nanostrukturen allerdings abweichende Beobachtungen gemacht. Das Live-Dead-Staining von Neuronen auf Pillars zeigte eine Entwicklung von teilweise vitalem Wachstum an DIV 4 hin zu großflächigem Absterben der Zellen an DIV 7. Für planare Goldsubstrate wurde dagegen ein gewohnt vitales Wachstum der Neuronen an allen Tagen beobachtet. Die Resultate für Neuronen waren unabhängig von der gewählten Beschichtung.

Erklärungsansätze für die niedrige Vitalität der Neuronen auf Nanopillars lieferten die folgenden REM- und FIB-Untersuchungen, durch die große Abstände und damit eine geringe Adhäsion zwischen Zellmembran und Nanopillars entdeckt wurden. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Gold-Nanopillars das Wachstum der Neuronen dahingehend beeinflussen, dass eine Verminderung der Zelladhäsion eintritt, die dann zum Absterben der Neuronen führt. Mit einer Fluoreszenzfärbung der Aktinfilamente konnten auf Nanopillars Veränderungen im Zytoskelett der Rattenneuronen nachgewiesen werden. Das Resultat dieser Veränderungen war das Fehlen von Wachstumskegeln an den Neuriten der Neuronen, die auf Pillars gewachsen waren. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Nanostrukturen starken Einfluss nehmen auf die Vorgänge im Zytoskelett, wodurch sich die Zell-Adhäsionsmechanismen drastisch ändern.

Eine weitere Hypothese für die niedrige Vitalität von Rattenneuronen auf Gold-Nanopillars bestand in der Vermutung, dass sich während der Zellkultivierung in den Zwischenräumen der Pillars noch Reste von Chemikalien aus dem Herstellungsprozess befunden haben. Um den Einfluss von Cyanid und KOH dabei auszuschließen, wurden Referenzuntersuchungen an planarem Gold durchgeführt, das zuvor mit diesen Substanzen behandelt wurde. Auf diesen Proben wurden vitale und gut adhärierte Neuronen verzeichnet. Mit dieser Beobachtung erhärtete sich nun die Vermutung, dass die niedrige Vitalität und die gerin-

ge Adhäsion der Neuronen auf Gold-Nanopillars mit deren Geometrie und Topographie zu begründen sind. Es kann zwar nach den Referenzmessungen nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass sich zwischen den Nanopillars noch Substanzen befanden, die auch nach mehrstündigem Spülen dort verblieben sind und erst im Verlauf der Zellkultur die Neuronen geschädigt haben. Allerdings spricht gegen den schädigenden Einfluss von Kontaminationen, dass die Neuronen auf den planaren Rändern aller Pillar-Proben überlebt haben, während nur in der nanostrukturierten Mitte das Absterben beobachtet wurde. Damit sind Geometrie und Topographie der Gold-Nanopillars sehr wahrscheinlich hauptverantwortlich für die mangelnde Adhäsion und die geringe Vitalität der Rattenneuronen, die auf ihnen beobachtet wurde.

Auch vorherige Studien zum Zellwachstum auf Nanostrukturen haben bereits ergeben, dass Nanostrukturen einen deutlichen Einfluss auf das Zytoskelett haben und vor allem zur Regulierung kollektiver Zellfunktionen beitragen ^[77]. Nanostrukturierte Substrate scheinen maßgeblichen Einfluss auf die adhärierte Zellfläche und die Ausbildung von Adhäsionspunkten auf dem Substrat sowie auf die Zellorientierung und -bewegung zu haben ^[76]. Speziell zum Wachstum von Neuronen auf Polymer-Nanostrukturen und Si-Nanopillars liegen erste Veröffentlichungen vor. Die Studie von Dowell-Mesfin belegte deutliche Veränderungen in der Neuronenpolarität, der Axonlänge und der Struktur der Wachstumskegel, wenn Si-Nanopillars als Substrat dienen ^[88]. Vor allem die Veränderung der Wachstumskegel konnte mit den hier gezeigten Ergebnissen zum Wachstum von Neuronen auf Gold-Nanopillars bestätigt werden. Auch die beobachtete negative Beeinflussung der Adhäsion von Neuronen auf Gold-Nanopillars belegt den gegenwärtigen Stand der Forschung. Auf den von Johansson untersuchten PMMA-Nanostrukturen gelang die Zielfindung der Axone erst dann, wenn die lateralen Abmessungen größer als 100 nm waren ^[87]. Dieses Resultat bekräftigt noch einmal, dass die Geometrie der Nanostrukturen einen entscheidenden Einfluss auf das Neuronenwachstum hat. Daher könnte in künftigen Studien durch die Verwendung verschiedener Geometrien von Gold-Nanopillars das Zellwachstum eventuell positiv beeinflusst werden. Für HEK-Zellen konnte von Kim et al. vitales Wachstum auf Si-Nanowires nachgewiesen werden, das mit einem Eindringen der Nanowires in das Zellinnere verbunden war ^[86]. Diese Veröffentlichung stimmt in Bezug auf das vitale Wachstum von HEK-Zellen mit den hier gezeigten Ergebnisse zum Wachstum von Zelllinien auf Gold-Nanopillars überein.

Weiterführende Zellversuche mit Nanopillars unterschiedlicher Geometrien und Topographien sind nun zwingend erforderlich, da sie Aufschluss darüber geben können, welche

Geometrien der Gold-Nanopillars die Neuronen genau schädigen und ob es eventuell Geometrien gibt, die das Überleben von Neuronenkulturen ermöglichen.

6.3 Signableitung mit nanostrukturierten Gold-MEAs

Herstellung von nanostrukturierten Gold-MEAs

Im Anschluss an die Untersuchung von großflächigen Gold-Nanopillar-Substraten wurde der Anodisierungs- und Galvanisierungsprozess auf die Nanostrukturierung von Gold-MEAs übertragen. Als Schwachstelle in dieser Methode stellte sich die Passivierungsschicht der MEAs heraus. Um elektrisch isolierende Schichten zu erhalten, wurden Fotolacke, Polymere sowie Schichten aus Siliziumoxid und -nitrid verwendet. Fast alle dieser Schichten litten unter dem Nanostrukturierungsprozess, in dem die MEAs mit Säuren, Lauge und Cyanid in Berührung kamen und ca. 5 Min lang einer Spannung von 40 V ausgesetzt waren. Infolgedessen wurden die Passivierungen in den meisten Fällen porös oder platzten sogar ab. Die dichteste Passivierung wurde schließlich mit einer 800 nm dicken ONO-Schicht erzielt. Diese Passivierung ermöglichte erstmals die hier präsentierte reproduzierbare Herstellung von Nanopillars auf planaren Gold-MEAs. Der Prozess lieferte eine stabile Ausbeute von Nanopillars, da auf den nanostrukturierten MEAs in der Regel 95 % aller Elektrodenfenster dicht mit Nanopillars bewachsen waren. Nur auf 8 μm großen Elektroden wuchsen die Pillars mit vergleichsweise geringer Dichte. Auf den einzelnen Elektrodenfenstern befand sich zudem für alle Durchmesser ein Randbereich ohne Nanopillars, weil auf dem äußeren Rand zur Passivierung hin das Aluminium nicht ausreichend auf den Elektroden haften konnte. Daher konnte der Außenkreis nicht anodisiert werden, weswegen es hier nicht zum Pillarwachstum kam.

Ableitung extrazellulärer Signale mit Nanopillar-MEAs

Mit den nanostrukturierten MEAs konnten nun reproduzierbare Aktionspotenziale von HL1-Zellen abgeleitet werden, aus denen anschließend die Signal-Rausch-Verhältnisse der Nanopillar-Elektroden ermittelt wurden. Im Vergleich aller Elektrodendurchmesser wurden die höchsten Aktionspotenziale jeweils mit nanostrukturierten MEAs erreicht. Allerdings waren sie meist nur geringfügig höher als die Amplituden der zugehörigen planaren MEAs. Ein Vergleich der Signal-Rausch-Verhältnisse für beide Elektrodentypen belegte,

dass die Signalqualität gegenüber planaren MEAs in Abhängigkeit vom Elektrodendurchmesser erhöht werden konnte. Für $10\text{ }\mu\text{m}$ große Elektroden wurde der höchste Vergrößerungsfaktor von 2,2 erreicht, gefolgt von $15\text{ }\mu\text{m}$ großen MEAs mit einem Faktor von 1,7. Für MEAs mit $20\text{ }\mu\text{m}$ und $8\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser ergaben sich dagegen nur Vergrößerungsfaktoren, die knapp über 1 lagen, so dass hier kaum eine signifikante Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch Nanopillars erreicht wurde.

Insgesamt war die Ermittlung der durchschnittlichen Aktionspotenziale und Signal-Rausch-Verhältnisse pro Elektrodendurchmesser bei allen MEA-Typen mit sehr hohen Standardabweichungen behaftet. Diese Abweichungen sind durch Schwankungen in der Kultivierung der HL1-Zellen zu begründen, die zu unterschiedlichen Zelldichten auf den Chips führten. Auch Schwankungen in der Fibronektin-Beschichtung können die Qualität der extrazellulären Signale beeinflusst haben, da die Beschichtung maßgeblich die Dichte der Zellkultur und die Kopplung der Zellen an die Elektroden steuert. Außerdem lagen pro Zellkultur nur relativ niedrige Stichprobenzahlen vor. Eine Wiederholung der Zellkulturen mit höheren Probenzahlen kann in Zukunft helfen, die jeweiligen Standardabweichungen zu senken, um verlässlichere Aussagen über die Verbesserung der Signalqualität machen zu können. Ebenso können eventuelle Rückstände aus vorherigen Zellkultur-Experimenten einen Einfluss auf die Zellkopplung gehabt haben. Denn bei einer wiederholten Verwendung von MEA-Chips konnte gezeigt werden, dass die mehrschrittigen Reinigungsprozesse die Elektrodenoberfläche und die Passivierung schädigten (s. Abb. 5.52). Dieser Aspekt kann ebenfalls Auswirkungen auf die Qualität der abgeleiteten Signale gehabt haben. Vor allem waren hier Elektroden betroffen, auf denen die Pillars nicht sehr dicht gewachsen waren, weshalb für künftige Signalableitungen ausschließlich MEAs mit dicht gewachsenen Nanopillars verwendet werden sollten. Neben der gezielten Optimierung der Zellkulturbedingungen sollte künftig auch eine Modifikation der Nanopillars auf den MEAs hin zu noch längeren Nanostrukturen angestrebt werden. Über die entsprechende Vergrößerung der Pillaroberfläche durch ein erhöhtes Aspektverhältnis könnte dann das Signal-Rausch-Verhältnis noch weiter erhöht werden.

Elektrochemische Charakterisierung von nanostrukturierten Gold-MEAs

Im Anschluss an die Ableitung extrazellulärer Signale von HL1-Zellen wurde von den Elektroden, die die höchsten Aktionspotenziale lieferten, mittels Impedanzspektroskopie die Kapazität bestimmt. Für alle vier Elektrodendurchmesser streuten die gemessenen Kapazitäten sehr stark. Eine signifikante Erhöhung der Kapazität durch Nanopillars konnte aufgrund dessen nicht nachgewiesen werden. Als Grund für die schwankenden Kapazitäten wurden Variationen in der Qualität der Passivierung vermutet, hervorgerufen z.B. durch

Pinholes, die während der Nanostrukturierung der MEAs oder auch während der Reinigung nach der Zellkultur entstanden sein können. Trotz der beobachteten Schwankungen und des starken Einflusses der Passivierung auf die Elektrodenkapazität war insgesamt ein leicht ansteigender Trend der Kapazitäten von $8\text{ }\mu\text{m}$ hin zu $20\text{ }\mu\text{m}$ großen MEAs zu verzeichnen, der auf die zunehmende Elektrodenfläche zurückzuführen ist.

Nach der Bestimmung der Kapazitäten von nanostrukturierten und planaren MEAs mittels Impedanzspektroskopie wurden mit einem Lock-In-Verstärker die Transfercharakteristika untersucht. Am Beispiel ausgewählter Datensätze von $10\text{ }\mu\text{m}$ großen Elektroden wurden über die Gleichungen 4.4 und 4.5 die Zusammenhänge zwischen der Impedanz Z_{leak} der Passivierungsschicht, der Elektrodenimpedanz Z_{el} und den vorher gemessenen Aktionspotenzialen analysiert. Mit dieser Auswertung sollten Erklärungsansätze für die stark streuenden Amplituden und Kapazitäten aus den vorhergehenden Versuchsteilen gefunden werden.

Für zwei Pillar-Proben wurden Elektrodenimpedanzen gefunden, die das Verhältnis der gemessenen Amplituden belegen konnten. Für vergleichende planare MEAs konnte diese Beobachtung allerdings nicht gemacht werden. Für beide MEA-Typen wurde aus dieser Analyse ersichtlich, dass die Impedanz der Passivierung eine wesentliche Rolle bei der Ableitung extrazellulärer Signale spielt. Wird das in Abb. 4.11 gezeigte Modell zur Zellkopplung noch um die Kopplungsimpedanz Z_K zwischen Zelle und Elektrode erweitert, ergibt sich die Anordnung, die in Abb. 6.1 dargestellt ist. In diesem Modell gilt für die Spannung U_i die Relation

$$U_i = I_0 \cdot \frac{Z_K \cdot Z_{leak}}{Z_{leak} + Z_{el} + Z_K} \quad (6.1)$$

Aus dieser Gleichung lässt sich ablesen, dass für den Idealfall von starker Zellkopplung und dichter Passivierung, d.h. für hohe Z_K und Z_{leak} , die Elektrodenimpedanz Z_{el} vernachlässigbar ist, da sie die resultierende Amplitude dann nicht merklich beeinflusst. Allerdings kommt es unter realen Bedingungen häufig zu Schwankungen in der Zellkultur, die mit einer geringen Zellkopplung einhergehen. Auch die isolierenden Eigenschaften der Passivierung sind nicht immer gewährleistet. In diesem Fall sind Kopplungsimpedanz Z_K und Passivierungsimpedanz Z_{leak} besonders klein, wodurch die Impedanz Z_{el} zunehmend an Bedeutung für die Qualität der Signableitung gewinnt.

Gerade die starke Variation von Z_K aufgrund von Schwankungen in der Zellkultur macht es erforderlich, dass Z_{el} und Z_{leak} optimiert werden. Idealerweise sollte Z_{el} um eine Größenordnung niedriger sein als Z_{leak} , um eine verlässliche Signableitung mit hohem Signal-

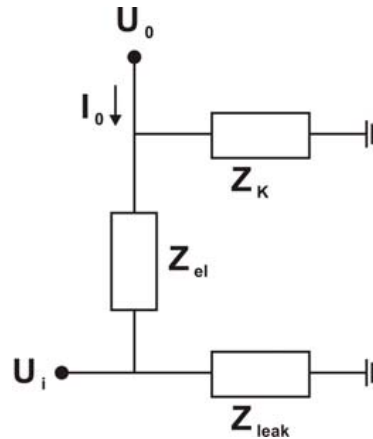


Abbildung 6.1: Erweitertes Modell eines Spannungsteilers zur Zellkopplung an eine Mikroelektrode. Z_K : Kopplungsimpedanz, Z_{leak} : Impedanz der Passivierung, Z_{el} : Elektrodenimpedanz

Rausch-Verhältnis zu gewährleisten. Daher ist bei der Herstellung von nanostrukturierten MEAs besonders auf die Qualität der Passivierungsschichten zu achten, um Pinholes zu vermeiden, durch die es zu einem Kontakt mit den darunter liegenden Leiterbahnen kommen kann. Vor allem nach der Fabrikation der Nanopillars sollte die Passivierung eingehend geprüft werden, um eine Schädigung durch die Verwendung von Säuren, Laugen, Cyanid und das Anlegen der Anodisierungsspannung auszuschließen. Außerdem kann die Verwendung höherer Pillars helfen, Z_{el} so weit zu senken, dass störende Einflüsse einer eventuell undichten Passivierung durch den impedanzsenkenden Einfluss der Nanostrukturen überwogen werden. Wichtig ist zudem noch, dass der Reinigungsprozess der MEAs für wiederholte Zellkultur-Experimente künftig dahingehend optimiert wird, dass die Passivierungsschicht auch bei mehrfacher Verwendung der Chips ihre isolierende Eigenschaft behält.

Vergleich von Gold-Nanopillar-MEAs mit bisherigen Elektrodenmaterialien

Vergleicht man die Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit mit nanostrukturierten Gold-MEAs erzielt wurden, mit den Resultaten bestehender Elektroden designs, so sind deutliche Unterschiede festzustellen. Die Kennwerte für bereits existierende Elektroden aus ITO, planarem Platin, Platin black und Ti_3N_4 sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

Material	Signalrauschen [μV]	Kapazität [$\frac{\mu F}{cm^2}$]	Elektrodenoberfläche [cm^2]
ITO	1,9 - 2,5	3	$1,6 \cdot 10^{-5}$
Platin	1,3 - 1,6	6 (21)	$1,6 \cdot 10^{-5}$
Platin black	0,3 - 0,6	7 (80)	$1,6 \cdot 10^{-5}$
Ti ₃ N ₄	1,4 - 3,5	70	$0,71 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 6.1: Kennwerte verschiedener Elektrodentypen, abgelesen bei 1 kHz ^[2, 7]. Die Kapazitäten für Platin und Platin Black in Klammern wurden aus ^[102] entnommen und beziehen sich auf Elektroden vom Durchmesser 40 μm .

Für das Signalrauschen zeigen diese vier Elektrodenmaterialien Werte zwischen 0,3 und maximal 3,5 μV . Mit den Rauschstärken dieser größtenteils porösen Elektrodenmaterialien lassen sich biologische Signale detektieren, deren Amplitude zwischen 0,1 und 1 mV liegt ^[7]. Bisherige planare Metallelektroden ermöglichten dagegen nur die Ableitung von Signalen im Bereich von 0,01 bis 0,1 mV und führten überdies zu einem hohen Signalverlust aufgrund von Rauschen ^[30]. Über die hier untersuchten nanostrukturierten MEAs kann bislang keine Aussage über das Rauschen getroffen werden, zumal diese Größe auch von den verwendeten Verstärkersystemen abhängt. Es sollte allerdings in weiterführenden Experimenten darauf geachtet werden, dass das Rauschen im Bereich der Werte aus Tabelle 6.1 liegt. Mit den nanostrukturierten Gold-MEAs war es schließlich möglich, maximale Aktionspotenziale von 1,2 mV zu messen. Im Vergleich zu den niedrigen Signalamplituden von etablierten planaren Elektroden konnten mit Nanopillar-MEAs bereits deutliche Verbesserungen der Signalqualität erzielt werden. Zudem liegen diese Signalamplituden auch schon im Bereich poröser Materialien. Sicherlich können die maximal ableitbaren Aktionspotenziale in Zukunft durch gezielte Anpassung der Pillargeometrie noch weiter erhöht werden.

Die Elektrodenoberfläche der verschiedenen Materialien aus Tab. 6.1 betrug zwischen $0,71 \cdot 10^{-5}$ und $1,6 \cdot 10^{-5} cm^2$. Betrachtet man im Vergleich dazu eine einzelne 20 μm große planare Gold-Mikroelektrode, so ergibt sich für diese Elektrode eine Oberfläche von $3,14 \cdot 10^{-6} cm^2$. Durch die Modifikation mit ca. 180 nm hohen Gold-Nanopillars, wie sie in Kapitel 5.1 mittels REM geometrisch untersucht wurden, kann die spezifische Oberfläche dieser Mikroelektrode ca. um den Faktor 10 auf $3,14 \cdot 10^{-5} cm^2$ erhöht werden. Damit liefern diese Nanopillars bereits Elektrodenoberflächen, die größer sind als die Flächen bisheriger Materialien. Die Nanopillars, mit denen die MEAs in den hier gezeigten Ableitungs-Experimenten modifiziert wurden, waren sogar 300 bis 400 nm hoch und hatten einen Durchmesser von ca. 60 nm (s. Kapitel 5.3). Dementsprechend war die Elek-

trodenoberfläche ca. um den Faktor 16 gegenüber der Grundfläche erhöht und lag damit ungefähr bei $5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2$. Mit Modifikationen durch noch längere Nanopillars ließe sich die Elektrodenfläche in Zukunft deutlich weiter vergrößern.

Die Erhöhung des Aspektverhältnisses der Nanopillars könnte auch dem weit verbreiteten Problem einer Schicht von toten Zellen auf den Elektroden vorbeugen, die oftmals die extrazelluläre Signableitung blockiert [2, 30]. Für den Einsatz höherer Nanostrukturen fehlte es bei bisherigen porösen und nanostrukturierten Elektroden oft an der notwendigen mechanischen Stabilität, da sich diese Materialien abgelöst haben und daher nur eingeschränkt gereinigt werden konnten [7, 27, 30, 31]. Die hier verwendeten Gold-Nanopillars zeigten dagegen eine ausreichende mechanische Stabilität, wenn sie dicht gewachsen waren. Allerdings kam es bei weniger dicht bewachsenen Elektroden nach der Zellkultur zum teilweisen Umknicken der Pillars. Ein Verstopfen der Nanopillars mit Proteinen oder anderen Beschichtungen, das ebenfalls ein häufiges Problem darstellt [7], wurde während der hier gezeigten Signableitungen nicht beobachtet. Damit erlauben die mechanischen Eigenschaften der Gold-Nanopillars bei entsprechender Modifikation der Reinigungsprozedur eine mehrfache Verwendung von nanostrukturierten Gold-MEAs. Insgesamt ist der mehrschrittige Prozess zur Nanostrukturierung zwar aufwändig, aber auch die Herstellung anderer poröser Elektrodenmaterialien ist zeitintensiv, so dass sich hieraus kein wesentlicher Nachteil für eine Modifikation von MEAs mit Gold-Nanopillars ergibt.

Die spezifischen Kapazitäten von MEAs mit ITO, Platin, Platin black und Ti_3N_4 lagen laut Heuschkel zwischen 3 und $70 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ [2, 7]. In Gabriels Studie wurden für Elektroden aus Platin und Platin black spezifische Kapazitäten von $21 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ und $80 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ ermittelt [102]. Damit liegen für bisher verwendete Elektrodenmaterialien voneinander abweichende Referenzwerte vor, die sich um eine Größenordnung unterscheiden. Vergleicht man die spezifischen Kapazitäten dieser Elektrodentypen mit den elektrochemischen Untersuchungen an großflächigen Gold-Nanopillar-Elektroden in Kapitel 5.2, so lagen an diesen Oberflächen bereits höhere spezifische Kapazitäten vor. Aus den Impedanzspektren wurden - bezogen auf die Grundfläche der Elektroden von $0,35 \text{ cm}^2$ - spezifische Kapazitäten um $125 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ ermittelt. Wenn sich diese Größenordnung der spezifischen Kapazitäten künftig auf Nanopillar-MEAs übertragen lässt und zudem das Rauschen während der extrazellulären Signableitung gesenkt werden kann, bieten MEAs mit Gold-Nanopillars - kombiniert mit einer dichten Passivierung - in Zukunft eine viel versprechende Alternative gegenüber bisherigen planaren und porösen Elektrodenmaterialien. Überdies ist mit den biokompatiblen Gold-Nanostrukturen die Möglichkeit für zahlreiche Oberflächenmodifikationen durch Thiolbindungen gegeben, die das Zellwachstum positiv beeinflussen können.

7 Ausblick

Mit nanoporösem Aluminiumoxid konnten in dieser Arbeit Gold-Nanopillar-Oberflächen mit reproduzierbaren Geometrien hergestellt werden. Die strukturelle und elektrochemische Charakterisierung zeigte Zusammenhänge zwischen dem elektrochemischen Verhalten der Nanostrukturen und den geometrischen Abmessungen. Um diese Ergebnisse zu ergänzen, sind Untersuchungen mit Nanopillars verschiedener Geometrien notwendig. Dies erfordert eine Anpassung des Anodisierungsprozesses, mit dem die Geometrie der Nanoporen gesteuert wird. Vor allem die Verwendung verschiedener Säuren und Temperaturen kann in Zukunft einen Beitrag dazu leisten, Nanoporen und daraus Pillars mit einer Variation von Geometrien herzustellen, deren Oberflächenvergrößerung dann elektrochemisch untersucht wird.

Auch für die weiterführende Untersuchung der Kopplung an elektroaktive Zellen ist die gezielte Veränderung der Pillargeometrien unablässig. Beim Wachstum von Zellen auf Gold-Nanopillars spielt ergänzend zur Geometrie auch die Topographie der Nanostrukturen eine wichtige Rolle. Die präzise Kontrolle dieser beiden Parameter kann in künftigen Studien zu einem besseren Verständnis der Beeinflussung der Zellen durch Gold-Nanopillars beitragen. Vor allem für das Wachstum von Neuronen auf Gold-Nanopillar-Arrays ist dieser Aspekt wichtig, um die geringe Vitalität und Adhäsion der Neuronen auf den Nanopillars zu verstehen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen kann in Zukunft vielleicht doch vitales Neuronenwachstum auf Nanopillar-Oberflächen erzielt werden.

Einen ergänzenden Aspekt zur Zellkopplung an Gold-Nanopillars kann auch die lithographische Vorstrukturierung der Nanostrukturen liefern, die in dieser Arbeit bereits ansatzweise vorgestellt wurde. Durch die Vereinzelung der Gold-Nanostrukturen, wie sie in Abb. 7.1 gezeigt ist, könnte in Zukunft eine weitergehende Miniaturisierung der Elektroden erreicht werden. Wird zudem das Aspektverhältnis dieser einzelnen Nanostrukturen erheblich erhöht, könnte bei einer Besiedlung mit Zellen eventuell ein Eindringen der Na-

nostrukturen in das Zellinnere möglich sein. Mit diesem Ansatz könnte später vielleicht sogar die Messung von intrazellulären Signalen realisiert werden.

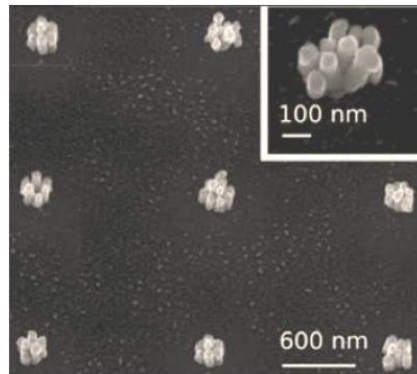


Abbildung 7.1: Vorstrukturierte Bündel von Gold-Nanopillars ^[103]

Die Nanostrukturierung von MEAs konnte in der vorliegenden Arbeit erfolgreich etabliert werden. Sowohl der Nanostrukturierungsprozess als auch die anschließende Ableitung extrazellulärer Signale hingen allerdings stark von der Qualität der Passivierungsschichten ab. Dies bestätigten auch die folgenden elektrochemischen Untersuchungen an nanostrukturierten MEAs. Bei der Herstellung von Gold-Nanopillars sollte daher in Zukunft besonderes Augenmerk auf eine stabile Passivierungsschicht gelegt werden. Durch eine dichte Isolierung können störende Leckströme bei der Signableitung vermieden werden, und der Vorteil der Impedanzsenkung durch Gold-Nanopillars kann so messbar realisiert werden. Auch das Signal-Rausch-Verhältnis wurde bei den hier gezeigten Messungen stark von der Passivierungsschicht beeinflusst, wodurch es - ebenso wie bei den Impedanzmessungen - zu starken Schwankungen kam. Durch eine verlässlich dichte Passivierungsschicht kann dieses Problem in zukünftigen Studien gelöst werden. Mit Hilfe einer dichten Passivierung werden dann auch deutlichere Aussagen über die angestrebte Verbesserung der Signalqualität durch Gold-Nanopillars möglich sein. Außerdem ist es im Hinblick auf die Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses sinnvoll, das Aspektverhältnis der Nanopillars noch stärker zu erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund ihrer guten Kopplungseigenschaften HL1-Zellen zur Signableitung verwendet. In weiterführenden Experimenten sollte nun versucht werden, die Ableitung von neuronalen Zellen zu realisieren. Zwar waren Vitalität und Adhäsion der Neuronen auf großflächigen Pillar-Arrays sehr schlecht, allerdings ist auf den

Mikroelektroden nur ein vergleichsweise kleiner Bereich mit Nanopillars bewachsen. Zudem befindet sich um die Pillars herum die biokompatible und planare Passivierungsschicht aus Siliziumoxid und -nitrid, die den Großteil der MEA-Fläche ausmacht. Exemplarisch konnte bereits eine Neuronenkultur auf nanostrukturierten MEAs gezüchtet werden, die in Abb. 7.2 zu sehen ist. Die MEAs wurden zuvor mittels Microcontact-Printing mit pECM beschichtet, so dass die Zellkörper der Neuronen sich auf den Elektrodenfenstern befanden. Gleichzeitig wuchsen die Neuriten entlang der gestempelten Proteininlinien zwischen den Elektroden. Nachdem hiermit gezeigt werden konnte, dass Neuronen prinzipiell auf nanostrukturierten MEAs wachsen, besteht der nächste Schritt darin, mittels Patch-Clamp-Experimenten Aktionspotenziale der Neuronen abzuleiten.

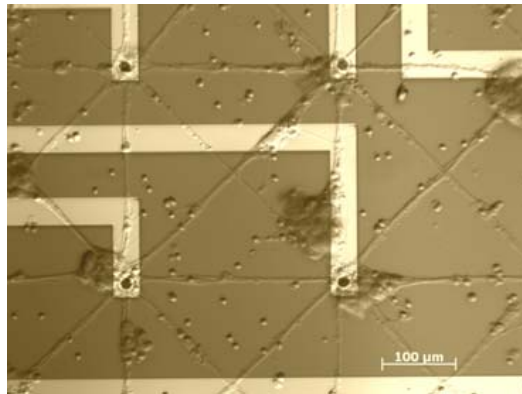


Abbildung 7.2: *Neuronen auf nanostrukturierten MEAs. Mittels Microcontact-Printing wurden die MEAs mit pECM beschichtet, um die Neuronen gezielt auf den Elektroden wachsen zu lassen.*

In Zukunft muss der Nanostrukturierungsprozess der MEAs dahingehend optimiert werden, dass die Passivierung dicht und beständig ist, um zuverlässige Signableitungen zu gewährleisten. Kann zudem die Impedanzsenkung, die für großflächige Pillar-Elektroden erreicht wurde, auf MEAs übertragen werden, z.B. durch gezielte Anpassung der Pillargeometrie, dann bieten MEAs mit biokompatiblen Gold-Nanopillars eine aussichtsreiche Alternative zur extrazellulären Signableitung gegenüber existierenden Elektrodenmaterialien.

Literaturverzeichnis

- [1] W. L. C. Rutten. Selective electrical interfaces with the nervous system. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4:407–452, 2002.
- [2] M. O. Heuschkel, M. Fejtl, M. Raggenbass, D. Bertrand, and P. Renaud. A three-dimensional multielectrode array for multisite stimulation and recording in acute brain slices. *Journal of Neuroscience Methods*, 114:135–148, 2002.
- [3] F. Greve, S. Frerker, A. G. Bittermann, C. Burkhardt, A. Hierlemann, and H. Hall. Molecular design and characterization of the neuron-microelectrode array interface. *Biomaterials*, 28:5246–5258, 2007.
- [4] U. Egert, B. Schlosshauer, S. Fennrich, W. Nisch, M. Fejtl, T. Knott, T. Müller, and H. Hämmerle. A novel organotypic long-term culture of the rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays. *Brain Research Protocol*, 2:229–242, 1998.
- [5] J. Pine. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *Journal of Neuroscience Methods*, 2:19–31, 1980.
- [6] C. A. Thomas, Jr., P. A. Springer, G. E. Loeb, Y. Berwald-Netter, and L. M. Okun. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Experimental Cell Research*, 74:61–66, 1972.
- [7] M. Taketani and M. Baudry. *Advances in Network Electrophysiology*. Springer, 2006.
- [8] G. W. Gross, A. Harsch, B. K. Rhoades, and W. Göpel. Odor, drug and toxin analysis with neuronal networks in vitro: extracellular array recording of network responses. *Biosensors & Bioelectronics*, 12:373–393, 1997.

- [9] H. Oka, K. Shimono, R. Ogawa, H. Sugihara, and M. Taketani. A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *Journal of Neuroscience Methods*, 93:61–67, 1999.
- [10] P. Fromherz, A. Offenhäusser, T. Vetter, and J. Weis. A neuron-silicon junction: a retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science*, 252:1290–1293, 1991.
- [11] A. Offenhäusser, C. Sprössler, M. Matsuzawa, and W. Knoll. Field-effect transistor array for monitoring electrical activity from mammalian neurons in culture. *Biosensors & Bioelectronics*, 12:819–826, 1997.
- [12] C. Leibrock, T. Müller, H. Hämmerle, and M. Fejtl. Netzwerkanalyse erregbarer zellen. *Neuroforum*, 1:13–15, 1999.
- [13] A. Prokop. Bioartificial organs in the twenty-first century: nanobiological devices. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 944:472–490, 2001.
- [14] A. Stett, U. Egert, E. Guenther, F. Hofmann, T. Meyer, W. Nisch, and H. Haemmerle. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377:486–495, 2003.
- [15] W. G. Regehr, J. Pine, C. S. Cohan, M. D. Mischke, and D. W. Tank. Sealing cultured invertebrate neurons to embedded dish electrodes facilitates long-term stimulation and recording. *Journal of Neuroscience Methods*, 30:91–106, 1989.
- [16] J. P. Kucera, M. O. Heuschkel, P. Renaud, and S. Rohr. Power-law behavior of beat-rate variability in monolayer cultures of neonatal rat ventricular myocytes. *Circulation Research*, 86:1140–1145, 2000.
- [17] Y. Nam, J. C. Chang, B. C. Wheeler, and G. J. Brewer. Gold-coated microelectrode array with thiol linked self-assembled monolayers for engineering neuronal cultures. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 51:158 – 165, 2004.
- [18] D. N. Adams, E. Y. Kao, C. L. Hypolite, M. D. Distefano, W. S. Hu, and P. C. Letourneau. Growth cones turn and migrate up an immobilized gradient of the laminin ikvav peptide. *Journal of Neurobiology*, 62:134–147, 2005.

- [19] D. A. Heller, V. Garga, K. J. Kelleher, T. C. Lee, S. Mahbubani, L.A. . Sigworth, T. R. Lee, and M. A. Rea. Patterned networks of mouse hippocampal neurons on peptide coated gold surfaces. *Biomaterials*, 26:883–889, 2005.
- [20] K. Tashiro, G. C. Sephel, B. Weeks, M. Sasaki, G. R. Martin, H. K. Kleinman, and Y. Yamada. A synthetic peptide containing the ikvav sequence from the a chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *The Journal of Biological Chemistry*, 264:16174–16182, 1989.
- [21] K. M. Yamada. Adhesive recognition sequences. *The Journal of Biological Chemistry*, 266:12809–12812, 1991.
- [22] H. Hämmerle, U. Egert, A. Mohr, and W. Nisch. Extracellular recording in neuronal networks with substrate integrated microelectrode arrays. *Biosensors & Bioelectronics*, 9:691–696, 1994.
- [23] M. Krause, S. Ingebrandt, D. Richter, M. Denyer, M. Scholl, C. Sprössler, and A. Offenhäusser. Extended gate electrode arrays for extracellular signal recordings. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 70:101–107, 2000.
- [24] M. Meister, J. Pine, and D. A. Baylor. Multi-neuronal signals from the retina: acquisition and analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, 51:95–106, 1994.
- [25] S. A. Boppard, B. C. Wheeler, and C. S. Wallace. A flexible perforated micro-electrode array for extended neural recordings. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 39:37–42, 1992.
- [26] L. Stoppini, S. Duport, and P. Correges. A new extracellular multirecording system for electrophysiological studies: application to hippocampal organotypic cultures. *Journal of Neuroscience Methods*, 72:23–33, 1997.
- [27] P. Thiébaud, N. F. de Rooij, M. Koudelka-Hep, and L. Stoppini. Microelectrode arrays for electrophysiological monitoring of hippocampal organotypic slice cultures. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 44:1159–1163, 1997.
- [28] D. Sprössler, D. Richter, M. Denyer, and A. Offenhäusser. Long-term recording system based on field-effect transistor arrays for monitoring electrogenic cells in culture. *Biosensors & Bioelectronics*, 13:613–618, 1998.

- [29] L. Berdondini, M. Chiappalone, P. D. van der Wal, K. Imfeld, N. F. de Rooij, M. Koudelka-Hep, M. Tedesco, S. Martinoia, J. van Pelt, G. Le Masson, and A. Garrenne. A microelectrode array (mea) integrated with clustering structures for investigating in vitro neurodynamics in confined interconnected sub-populations of neurons. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114:530–541, 2006.
- [30] P. Thiébaud, C. Beuret, M. Koudelka-Hep, M. Bove, S. Martinoia, M. Grattarola, H. Jahnsen, R. Rebaudo, M. Balestrino, J. Zimmer, and Y. Dupont. An array of pt-tip microelectrodes for extracellular monitoring of activity of brain slices. *Biosensors and Bioelectronics*, 14:61–65, 1999.
- [31] P. Thiébaud, C. Beuret, N.F. de Rooij, and M. Koudelka-Hep. Microfabrication of pt-tip microelectrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 70:51–56, 2000.
- [32] S. Isik, L. Berdondini, J. Oni, A. Blöchl, M. Koudelka-Hep, and W. Schuhmann. Cell-compatible array of three-dimensional tip electrodes for the detection of nitric oxide release. *Biosensors & Bioelectronics*, 20:1566–1572, 2005.
- [33] J. C. Chang, G. J. Brewer, and B. C. Wheeler. Neuronal network structuring induces greater neuronal activity through enhanced astroglial development. *Journal of Neural Engineering*, 3:217–226, 2006.
- [34] K. Wang, H. A. Fishman, H. Dai, and J. S. Harris. Neural stimulation with a carbon nanotube microelectrode array. *Nano Letters*, 6:2042–2048, 2006.
- [35] T. D. B. Nguyen-Vu, H. Chen, A. M. Cassell, R. Andrews, M. Meyyappan, and J. Lian. Vertically aligned carbon nanofiber arrays: an advance toward electrical–neural interfaces. *Small*, 2(1):89–94, 2006.
- [36] M. Yang, F. Qu, Q. Lu, Y. He, G. Shen, and R. Yu. Platinum nanowire nanoelectrode array for the fabrication of biosensors. *Biomaterials*, 27:5944–5950, 2006.
- [37] F. Patolsky, B. P. Timko, G. Yu, Y. Fang, A. B. Greytak, G. Zheng, and C. M. Lieber. Detection, stimulation, and inhibition of neuronal signals with high-density nanowire transistor arrays. *Science*, 313:1100–1104, 2006.
- [38] B. Wolfrum, Y. Mourzina, D. Mayer, D. Schwaab, and A. Offenhäusser. Fabrication of large-scale patterned gold-nanopillar arrays on a silicon substrate using imprinted

- porous alumina templates. *Small*, 2(11):1256–1260, 2006.
- [39] M. S. Sander and L.-S. Tan. Nanoparticle arrays on surfaces fabricated using anodic alumina films as templates. *Advanced Functional Materials*, 13:393–397, 2003.
- [40] M. Lahav, T. Sehayek, A. Vaskevich, and I. Rubinstein. Nanoparticle nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition*, 42:5576–5579, 2003.
- [41] J. Li, C. Papadopoulos, J. M. Xu, and M. Moskovits. Highly-ordered carbon nanotube arrays for electronics applications. *Applied Physics Letters*, 75:367–369, 1999.
- [42] G. Hamm, C. Becker, and C. R. Henry. Bimetallic pd-au nanocluster arrays grown on nanostructured alumina templates. *Nanotechnology*, 17:1943–1947, 2006.
- [43] H. Masuda and M. Satoh. Fabrication of gold nanodot array using anodic porous alumina as an avaporation mask. *Japanese Journal of Applied Physics*, 35:L126–L129, 1996.
- [44] H. Masuda and K. Fukuda. Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina. *Science*, 268:1466–1468, 1995.
- [45] H. Masuda, K. Yada, and A. Asaka. Self-ordering of cell configuration of anodic porous alumina with large-size pores in phosphoric acid solution. *Japanese Journal of Applied Physics*, 37:L1340–L1342, 1998.
- [46] H. Masuda, H. Yamada, M. Satoh, and H. Asoh. Highly ordered nanochannel-array architecture in anodic alumina. *Applied Physics Letters*, 71:2770–2772, 1997.
- [47] O. Jessensky, F. Müller, and U. Gösele. Self-organized formation of hexagonal pore arrays in anodic alumina. *Applied Physics Letters*, 72:1173–1175, 1998.
- [48] A. P. Li, F. Müller, A. Birner, K. Nielsch, and U. Gösele. Hexagonal pore arrays with a 50-420 nm interpore distance formed by self-organization in anodic alumina. *Journal of Applied Physics*, 84:6023–6026, 1998.
- [49] D. Crouse, Y.-H. Lo, A. E. Miller, and M. Crouse. Self-ordered pore structure of anodized aluminum on silicon and pattern transfer. *Applied Physics Letters*, 76:

- 49–51, 2000.
- [50] Y. Yang, H. Chen, Y. Mei, J. Chen, X. Wu, and X. Bao. Anodic alumina template on au/si substrate and preparation of cds nanowires. *Solid State Communications*, 123:279–282, 2002.
- [51] B. Wolfrum, Y. Mourzina, F. Sommerhage, and A. Offenhäusser. Suspended nanoporous membranes as interfaces for neuronal biohybrid systems. *Nano Letters*, 6: 453–457, 2006.
- [52] A. P. Robinson, G. Burnell, M. Hu, and J. L. MacManus-Driscoll. Controlled, perfect ordering in ultrathin anodic aluminum oxide templates on silicon. *Applied Physics Letters*, 91:143123–1–143123–3, 2007.
- [53] S.-K. Hwang, S.-H. Jeong, H.-Y. Hwang, O.-J. Lee, and K.-H. Lee. Fabrication of highly ordered pore array in anodic alumina oxide. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 19:467–473, 2002.
- [54] V. P. Parkhutik and V. I. Shershulsky. Theoretical modelling of porous oxide growth on aluminium. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 25:1258–1263, 1992.
- [55] K. Nielsch, J. Choi, K. Schwirn, R. B. Wehrspohn, and U. Gösele. Self-ordering regimes of porous alumina: the 10 % porosity rule. *Nano Letters*, 2:677–680, 2002.
- [56] W. Lee, R. Ji, U. Gösele, and K. Nielsch. Fast fabrication of long-range ordered porous alumina membranes by hard anodization. *Nature Materials*, 5:741–747, 2006.
- [57] C. H. Hamann and W. Vielstich. *Elektrochemie*. WILEY-VCH, 2003.
- [58] A. J. Bard and L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [59] J. O. Bockris, A. K.N. Reddy, and M. Gamboa-Aldeco. *Modern Electrochemistry 2A - Fundamentals on Electrodics*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2000.
- [60] J. Ross. Macdonald. *Impedance Spectroscopy*. Wiley-Interscience, 1987.

- [61] F. Lisdat and D. Schäfer. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391:1555–1567, 2008.
- [62] M. Sluyters-Rehbach. Impedances of electrochemical systems: Terminology, nomenclature and representation. *Pure and Applied Chemistry*, 66:1831–1891, 1994.
- [63] R. M. Penner, M. J. Hebben, T. L. Longin, and N. S. Lewis. Fabrication and use of nanometer-sized electrodes in electrochemistry. *Science*, 250:1118–1121, 1990.
- [64] D. W. M. Arrigan. Nanoelectrodes, nanoelectrode arrays and their applications. *The Analyst*, 129:1157–1165, 2004.
- [65] P. Forrer, F. Schlottig, H. Siegenthaler, and M. Textor. Electrochemical preparation and surface properties of gold nanowire arrays formed by the template technique. *Journal of Applied Electrochemistry*, 30:533–541, 2000.
- [66] V. Anandan, Y. L Rao, and G. Zhang. Nanopillar array structures for enhancing biosensing performance. *International Journal of Nanomedicine*, 1(1):73–79, 2006.
- [67] N. A. Campbell and J. B. Reece. *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
- [68] E. Brechner, B. Dinkelaker, and D. Dreesmann. *Kompaktlexikon der Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
- [69] D. Freudig and R. Sauermost. *Lexikon der Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 2004.
- [70] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, and T. M. Jessell. *Principles of neural science*. McGraw-Hill, 2000.
- [71] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, 2004.
- [72] P. Christen and R. Jaussi. *Biochemie*. Springer Verlag, 2005.
- [73] H. Plattner and J. Hentschel. *Zellbiologie*. Thieme, 2002.

- [74] A. Curtis and C. Wilkinson. Topographical control of cells. *Biomaterials*, 18:1573–1583, 1997.
- [75] A. S. Curtis and C. D. Wilkinson. Reactions of cells to topography. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 9:1313–1329, 1998.
- [76] R.G. Flemming, C.J. Murphy, G.A. Abrams, S.L. Godman, and P.F. Nealey. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*, 20:573–588, 1999.
- [77] J. Y. Lim and H. J. Donahue. Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning. *Tissue Engineering*, 13:1879–1891, 2007.
- [78] A. I. Teixeira, G. A. Abrams, P. J. Bertics, C. J. Murphy, and P. F. Nealey. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *Journal of Cell Science*, 116:1881–1892, 2003.
- [79] N. W. Karuri, S. Liliensiek, A. I. Teixeira, G. Abrams, S. Campbell, P. F. Nealey, and C. J. Murphy. Biological length scale topography enhances cell-substratum adhesion of human corneal epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 116:1881–1892, 2004.
- [80] A. I. Teixeira, G. A. McKie, J. D. Foley, P. J. Bertics, P. F. Nealey, and C. J. Murphy. The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography. *Biomaterials*, 27:3945–3954, 2006.
- [81] W. A. Loesberg, J. te Riet, F. C. M. J. M. van Delft, P. Schön, C. G. Figdor, S. Speller, J. J. W. A. van Loon, X. F. Walboomers, and J. A. Jansen. The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion. *Biomaterials*, 28:3944–3951, 2007.
- [82] C. C. Berry, G. Campbell, A. Spadicino, M. Robertson, and A. S. G. Curtis. The influence of microscale topography on fibroblast attachment and motility. *Biomaterials*, 25:5781–5788, 2004.
- [83] J. Huang, S. V. Gräter, F. Corbellini, S. Rinck, E. Bock, R. Kemkemer, H. Kessler, J. Ding, and J. P. Spatz. Impact of order and disorder in rgd nanopatterns on cell

- adhesion. *Nano Letters*, 9:1111–1116, 2009.
- [84] J. Lee, B.S. Kang, B. Hicks, T. F. Chancellor, B. H. Chu, H.-T. Wang, B. G. Keselowsky, F. Ren, and T. P. Lele. The control of cell adhesion and viability by zinc oxide nanorods. *Biomaterials*, 29:3743–3749, 2008.
- [85] S. Qi, C. Yi, S. Ji, C.-C. Fong, and M. Yang. Cell adhesion and spreading behavior on vertically aligned silicon nanowire arrays. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 1:30–34, 2009.
- [86] W. Kim, J. K. Ng, M. E. Kunitake, B. R. Conklin, and P. Yang. Interfacing silicon nanowires with mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society*, 129:7228–7229, 2007.
- [87] F. Johansson, P. Carlberg, N. Danielsen, L. Montelius, and M. Kanje. Axonal outgrowth on nano-imprinted patterns. *Biomaterials*, 27:1251–1258, 2006.
- [88] N.M. Dowell-Mesfin, M.-A. Abdul-Karim, A.M.P. Turner, S. Schanz, H.G. Craighead, B. Roysam, J.N. Turner, and W. Shain. Topographically modified surfaces affect orientation and growth of hippocampal neurons. *Journal of Neural Engineering*, 1:78–90, 2004.
- [89] A. L. Hodgkin and A. F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, 117:500–544, 1952.
- [90] B. Hille. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates Inc., 1991.
- [91] R. Lind, P. Connolly, C. D. W. Wilkinson, and R. D. Thomson. Finite-element analysis applied to extracellular microelectrode design. *Sensors and Actuators B, Chemical*, 3:23–30, 1991.
- [92] P. Fromherz. Extracellular recording with transistors and the distribution of ionic conductances in a cell membrane. *European Biophysics Journal*, 28:254–258, 1999.
- [93] R. Schätzthauer and P. Fromherz. Neuron-silicon junction with voltage-gated ionic currents. *European Journal of Neuroscience*, 10:1956–1962, 1998.

- [94] J. R. Buitenweg, W. L. C. Rutten, E. Marani, S. K. L. Polman, and J. Ursum. Extracellular detection of active membrane currents in the neuron-electrode interface. *Journal of Neuroscience Methods*, 115:211–221, 2002.
- [95] J. R. Buitenweg, W. L. C. Rutten, and E. Marani. Modeled channel distributions explain extracellular recordings from cultured neurons sealed to microelectrodes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 49:1580–1590, 2002.
- [96] M. Jansen. Production and characterization of Au-nanopillar-electrodes for electrical coupling with neurons. *Diplomarbeit an der RWTH Aachen*, 2008.
- [97] F. Schröper. Optimierte Immobilisierung von Redoxproteinen an funktionale Elektrodenoberflächen für die molekulare Bioelektronik. *Dissertation an der RWTH Aachen*, 2009.
- [98] S. Eick. Intracellular stimulation of individual electrogenic cells with micro-scaled electrodes. *Dissertation an der RWTH Aachen*, 2009.
- [99] J. R. Wilson, W. Kobsiriphat, R. Mendoza, H.-Y. Chen, J. M. Hiller, D. J. Miller, K. Thornton, P. W. Voorhees, S. B. Adler, and S. A. Barnett. Three-dimensional reconstruction of a solid-oxide fuel-cell anode. *Nature Materials*, 541-544, 2006.
- [100] J. Wallys. Stimulation of individual electrogenic cells with micro-scale sirof electrodes. *Diplomarbeit an der RWTH Aachen*, 2007.
- [101] N. Kotman. Bidirectional coupling of neurons with a microchip integrating microelectrodes and field-effect transistors. *Diplomarbeit an der Universität Kassel*, 2008.
- [102] G. Gabriel, R. Gómez-Martínez, and R. Villa. Single-walled carbon nanotubes deposited on surface electrodes to improve interface impedance. *Physiological Measurement*, 29:S203–S212, 2008.
- [103] D. Weber. Gold-Nanosäulen-modifizierte Elektroden zur neuronalen Signalerkennung. *Diplomarbeit an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel*, 2009.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Andreas Offenhäusser, bedanken, der mir dieses überaus interessante Thema angeboten hat. Durch ihn war es mir möglich, mit Wissenschaftlern verschiedenster Fachrichtungen in einem anregenden und sehr gut ausgestatteten Umfeld zusammenzuarbeiten. Ich danke ihm für die regelmäßigen Diskussionen und die daraus resultierenden Anregungen, die zum Erfolg meines Projektes beigetragen haben. Außerdem verdanke ich ihm die Zugehörigkeit als Kollegiatin zur International Helmholtz Research School BioSoft, in der ich promotionsbegleitend viele interessante Veranstaltungen besucht und neue Kontakte geknüpft habe.

Bei Prof. Dr. Matthias Wuttig vom 1. Physikalischen Institut 1A der RWTH Aachen möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass er die Zweitbegutachtung meiner Arbeit übernommen und während meiner Dissertation immer wieder Interesse am Fortgang meiner Arbeit gezeigt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern, Dr. Yulia Mourzina und Dr. Bernhard Wolfrum, für ihre Unterstützung während der vergangenen Jahre. Mit anregenden Diskussionen, fachlichem Feedback und der Einführung in neue experimentelle Techniken haben sie mir dabei geholfen meine Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Michael Jansen möchte ich herzlich danken für die konstruktive Zusammenarbeit während seiner Diplomarbeit in unserer Gruppe. Durch seinen Ideenreichtum und sein Engagement hat er einen großen Beitrag zum Gelingen meiner Dissertation geleistet.

Dieter Weber danke ich ebenfalls für seine engagierte Arbeit als Diplomand in unserer Gruppe. Mit seinem materialwissenschaftlichen Hintergrund hat er neue Prozesse zur Herstellung einzelner Nanopillars etablieren können.

Dr. Hans Bohn gilt mein besonderer Dank für die wertvollen Diskussionen und experimentellen Hilfestellungen zur Impedanzspektroskopie.

Bei Dr. Dirk Mayer und Florian Schröper bedanke ich mich für die konstruktive Zusammenarbeit während unserer elektrochemischen Studien an Gold-Nanopillar-Arrays.

Herzlich danken möchte ich Dr. Kristin Michael, die mit der Etablierung von SAM-Beschichtungen einen entscheidenden Beitrag zu meinen Neuronen-Experimenten geleistet hat. Auch Dr. Petra Schulte hat mir jederzeit für Fragen zur Zellkultur zur Seite gestanden. Vanessa Maybeck gilt mein besonderer Dank für ihre Unterstützung bei der Ableitung extrazellulärer Signale.

Hans Peter Boehm danke ich für seine Unterstützung in der Rasterelektronenmikroskopie und die wertvollen Anregungen zur Auswertung von REM-Aufnahmen.

Ich danke Marko Banzet für seine Einführung in die Reinraumtechniken und die Unterstützung bei der Entwicklung neuer Elektrodendesigns im Reinraum.

Bei Hans Wingens bedanke ich mich für die Deposition metallischer Schichten und seine Ausdauer und Hilfestellung bei wiederkehrenden Problemen.

Dr. Manfred Lacher, Peter Holik, Marion Bär und Sam Schmitz haben mich mit der Prozessierung von MEAs im Reinraum des Forschungszentrums caesar in Bonn unterstützt, als im Reinraum des IBN fortwährende technische Probleme bestanden. Ich danke Ihnen für hilfreiche Diskussionen und die schnelle Umsetzung der geplanten Prozessierungen.

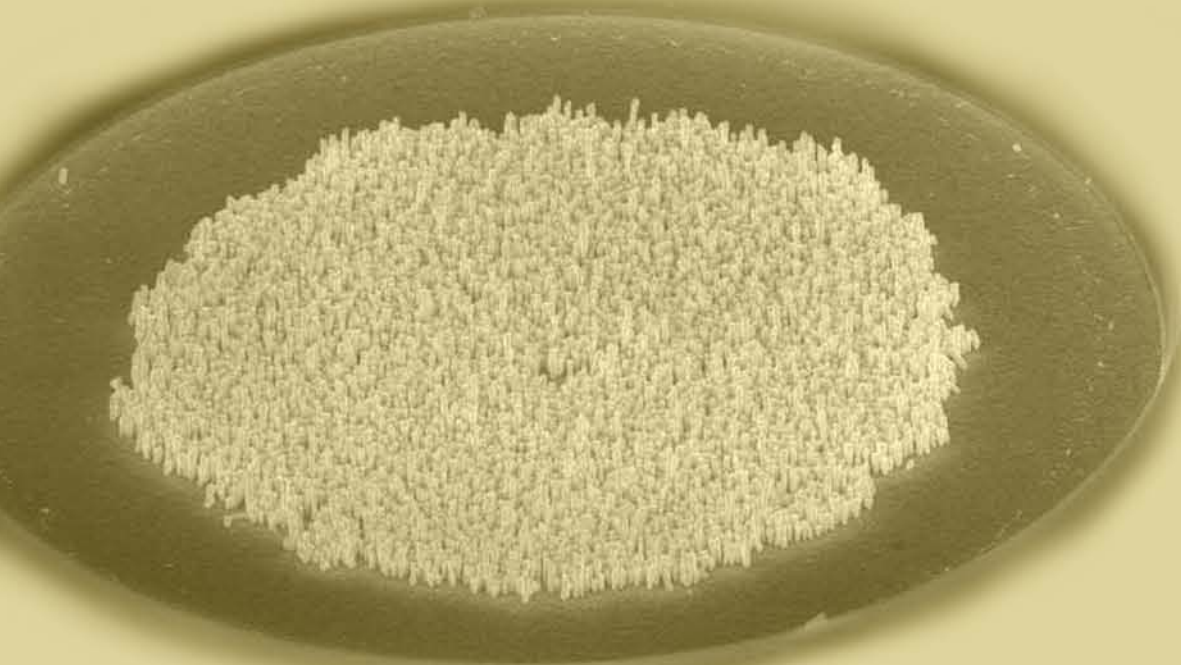
Bei Angelika Sehrbrock vom Forschungszentrum caesar bedanke ich mich herzlich für ihre Ausdauer und den Ideenreichtum bei den FIB-Messungen an meinen Zellproben.

Dankend erwähnen möchte ich auch die Mitarbeiter der elektronischen und mechanischen Werkstätten, die mich bei der Planung neuer experimenteller Aufbauten unterstützt und diese stets zügig realisiert haben.

Allen Kollegen des IBN-2, die mich während meiner Zeit im Forschungszentrum begleitet haben, möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre danken. Gerne erinnere ich mich an Gespräche im Work-Café, auf der Winter / Summer School oder auf dem Flur, die oftmals einen kleinen Baustein zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Für die finanzielle und ideelle Förderung meiner Doktorarbeit bedanke ich mich herzlich bei der Studienstiftung des deutschen Volkes, in deren Netzwerk ich mich bereits während meines Studiums sehr wohl gefühlt habe.

1. **Ferrocenes as Potential Building Blocks for Molecular Electronics**
Self-Assembly and Tunneling Spectroscopy
by L. Müller-Meskamp (2008), 153 pages
ISBN: 978-3-89336-509-8
2. **Magnetic Proximity Effects in Highly-ordered Transition Metal Oxide Heterosystems studied by Soft x-Ray Photoemission Electron Microscopy**
by I. P. Krug (2008), XX, 180 pages
ISBN: 978-3-89336-521-0
3. **Seltenerd-basierte ternäre Oxide als alternative Gatedielektrika**
von J. M. Roeckerath (2008), 148 Seiten
ISBN: 978-3-89336-543-2
4. **Strominduzierte Magnetisierungsdynamik in einkristallinen Nanosäulen**
von R. Lehdorff (2009), I, 86 Seiten
ISBN: 978-3-89336-564-7
5. **Magnetization Dynamics in Magnetically Coupled Heterostructures**
von A. Kaiser (2009), X, 121 pages
ISBN: 978-3-89336-577-7
6. **Resistive switching in Pt/TiO₂/PT**
by D. S. Jeong (2009), vii, 133 pages
ISBN: 978-3-89336-579-1
7. **Electromechanical Force Microscopy and Tip-Enhanced Raman Spectroscopy for Polar Oxide Nanoparticles**
by S. Röhrig (2009), vi, 114 pages
ISBN: 978-3-89336-600-2
8. **Investigation of resistive switching in barium strontium titanate thin films for memory applications**
by W. Shen (2010), 114 pages
ISBN: 978-3-89336-608-8
9. **Nanostrukturierte Metallelektroden zur funktionalen Kopplung an neuronale Zellen**
von D. Brüggemann (2010), vii, 160 Seiten
ISBN: 978-3-89336-627-9



Information / Information
Band / Volume 9
ISBN 978-3-89336-627-9